



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria

**Respuesta inmune humoral específica generada por
una vacuna recombinante de cisticercosis porcina**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médica Veterinaria

AUTOR

Viviana Edita SAN MARTÍN DÍAZ

ASESOR

Armando GONZÁLEZ ZARIQUIEY

Lima, Perú

2011



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

San Martín, V. Respuesta inmune humoral específica generada por una vacuna recombinante de cisticercosis porcina [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Académica Profesional de Medicina Veterinaria; 2011.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Doctor Armando González, por la confianza depositada en mí y todo el apoyo que me brindó durante la realización de la tesis. A la Dra. María Silva por su guía y tiempo. Al MV Eloy González por su apoyo en el análisis estadístico de la tesis. A todo el personal y compañeros de trabajo del Laboratorio de Medicina Preventiva de la UNMSM por su ayuda y colaboración en la realización de este trabajo.

Quiero agradecer al Doctor Felipe San Martín, por todo su apoyo, consejos y guía. Por estar siempre dispuesto a atender mis dudas y motivarme a realizar esta tesis.

DEDICATORIA

A mis padres, Pedro e Iris,
por todo su cariño y por ser
siempre mi ejemplo a seguir.

A mis hermanos, Pedro y Susana,
por estar siempre ahí y ser los
mejores amigos que puedo tener.

A Rocko, porque aunque sin darse
cuenta, me enseñó mucho más
de lo que se pueda imaginar.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA	iii
TABLA DE CONTENIDO	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE APÉNDICE	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
CISTICERCOSIS	3
Ciclo biológico de <i>T. solium</i>	3
Historia y evolución	5
Características del parásito	6
Importancia en la Salud Pública	9
Diagnóstico y tratamiento	12
Epidemiología de la teniasis y cisticercosis	18
Control del complejo teniasis-cisticercosis	21
VACUNA CONTRA LA CISTICERCOSIS PORCINA	22
Vacunas parasitarias	22
Vacunas recombinantes	23
Antígeno vacunal de cisticercosis (Tsol 18)	25
Cepa atenuada de Salmonella entérica var. Typhimurium	27
Operones de expresión de Salmonella (Control de la expresión genética.)	28
FAST-ELISA para detección específica de anticuerpos vacunales	30
Respuesta inmune inducida en ratones	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS	32
LUGAR DE ESTUDIO	32
NÚMERO DE MUESTRA Y ANIMALES DE ESTUDIO	32
PREPARACIÓN DEL CULTIVO VACUNAL	33
MANEJO DE ANIMALES	35

Llegada de animales	35
Vacunación	35
Infección	36
Recolección de suero	37
Necropsia y conteo de quistes	37
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS: FAST-ELISA.....	39
Preparación del Antígeno.	40
Preparación de la curva estándar	41
Optimización de los reactivos.....	41
Titulación del anticuerpo	42
Variabilidad de la prueba.....	43
Sueros problema	43
Análisis de resultados	44
IV. RESULTADOS	45
V. DISCUSIÓN	49
VI. CONCLUSIONES.....	54
VII. RECOMENDACIONES	55
VIII. LITERATURA CITADA	56
IX. APÉNDICE	65

RESUMEN

En este estudio se buscó determinar la respuesta inmune humoral específica producida en cerdos luego de ser vacunados con una vacuna recombinante de cisticercosis porcina. Esta vacuna tiene como vector a una *Salmonella* manipulada genéticamente, la cual porta un plásmido conteniendo el antígeno vacunal Tsol18. Para ello se vacunaron oralmente cerdos de dos meses de edad y posterior a la vacunación, los animales fueron infectados artificialmente. A todos los cerdos se les dio oralmente un proglótido de *T. solium* utilizando bolas de plátano con afrecho. Los animales fueron sangrados antes de la vacunación y cada semana posterior a esta, incluyendo el día en el que fueron sometidos a necropsia. El suero recolectado se analizó utilizando un FAST-ELISA desarrollado específicamente para detectar los anticuerpos producidos por esta vacuna. El día de la necropsia se analizó la carcasa de los cerdos en su totalidad en busca de cisticercos. Los cisticercos fueron contabilizados y clasificados en cisticercos vivos y muertos. La vacuna alcanzó una protección del 96%. Se encontraron cisticercos vivos en animales vacunados ($x=52.8$) como en animales no vacunados ($x=1322.3$), demostrando una diferencia significativa entre ambos grupos de animales. Los anticuerpos específicos en los animales vacunados presentaron un aumento en el transcurso del tiempo para luego disminuir tomando la forma de una distribución cuadrática. Mediante la fórmula de esta regresión se determinó que el nivel máximo de anticuerpos alcanzados (0.774ul IgG) fue el día 55 post vacunación. Se concluye que es posible utilizar cepas atenuadas de *Salmonella* como vector vacunal de cisticercosis porcina y que esta vacuna logra producir un alza de anticuerpos IgG específicos para el antígeno vacunal en cerdos.

Palabras claves: Cisticercosis, vacuna recombinante, salmonella, antígeno Tsol18, FAST-ELISA

ABSTRACT

This study sought to determine the specific humoral immune response produced in pigs after being vaccinated with a recombinant vaccine for swine cysticercosis. This vaccine's vector is a genetically engineered *Salmonella*, which carries a plasmid containing the vaccine antigen, Tsol18. In order to determine this, two months old pigs were orally vaccinated and after vaccination the animals were infected artificially. All pigs were orally given a *T. solium* proglottid using banana and bran balls. Animals were bled before vaccination and weekly thereafter to this, including the day in which they were subjected to necropsy. The serum collected was analyzed using a specifically developed FAST-ELISA for detecting antibodies produced by this vaccine. The day of the autopsy, the entire carcass was analyzed in search of cysticerci. Cysticerci were counted and classified as live and dead cysticerci. The vaccine was 96% protection. Cysticerci were found alive ($x = 52.8$) in vaccinated and unvaccinated animals ($x = 1322.3$), showing a significant difference between both groups of animals. Specific antibodies in vaccinated animals showed an increase over time and then decreased by taking the form of a quadratic distribution. By this regression formula was determined that the maximum level of antibodies achieved (0.774ul IgG) was on day 55 post vaccination. We conclude that is possible to use attenuated *Salmonella* strains as a vaccine vector for swine cysticercosis and that this vaccine produces a rise in IgG specific antibodies for the vaccine's antigen in pigs.

Key words: Cysticercosis, recombinant vaccine, salmonella, Tsol18 antigen, FAST-ELISA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Taenia solium</i>	4
Figura 2. Escólex de <i>Taenia solium</i>	6
Figura 3. Huevos conteniendo oncósferas de <i>T. Solium</i>	7
Figura 4. a) Cisticercos de <i>Taenia solium</i> (Tomado de Flisser et al., 2006). b) Cisticercos en musculatura (Tomado de: Garcia et al., 2005).....	8
Figura 5. a) Cerebro humano con cisticercosis parenquimatosa (Tomado de: Fleury et al., 2006). b) Presencia de quistes en musculatura (Tomado de: Garcia et al., 2003b).....	10
Figura 6. Esquema de la activación del operón arabinosa (Tomado de: Griffiths et al., 2008).....	29
Figura 7. Esquema de la represión del operón arabinosa (Tomado de: Griffiths et al., 2008).....	30
Figura 8. Ciclos utilizados en el PCR aplicado al cultivo vacunal	34
Figura 9. Dosificación oral de la vacuna recombinante de cisticercosis porcina a cerdos.	36
Figura 10. Titulación del Antígeno Tso118 para estandarización del FAST-ELISA para la detección de anticuerpos específicos de Tso118	42
Figura 11. Titulación del anticuerpo para estandarización del FAST-ELISA para la detección de anticuerpos específicos de Tso118.	43
Figura 13. Regresión obtenida a partir de los niveles de IgG encontradas en los animales vacunados con la vacuna recombinante de cisticercosis porcina.	48

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Antígenos recombinantes de oncósfera de tenia que han demostrado inducir una respuesta inmune protectora. Fuente: Lightowlers <i>et al.</i> , 2003.	26
Cuadro 2. Grupos experimentales utilizados en el estudio y sus características.....	33
Cuadro 3. Cisticercos y su porcentaje de evaginación encontrados a la necropsia de cerdos vacunados y no vacunados con la vacuna recombinante de cisticercosis porcina.	46

LISTA DE APÉNDICE

Apéndice 1. Ficha de necropsia.....	66
Apéndice 2. Tabla de conteo específico de quistes y evaginación.....	67
Apéndice 3. Número de cisticercos hallados en la necropsia de animales clasificado por miembro y órgano inspeccionado.....	70

I. INTRODUCCIÓN

Cisticercosis es una enfermedad zoonótica y parasitaria producida por el estadio larval del parásito *Taenia solium*, el cual afecta a cerdos y humanos tras la ingestión de los huevos del céstode (Flisser, 1994; Sciutto *et al.*, 2000). Esta enfermedad altamente endémica y de gran importancia en países desarrollados, está ligada a la crianza de cerdos en contacto directo o cercano con humanos, con escasez de higiene y falta de condiciones sanitarias (García y Del Brutto, 2005; Flisser *et al.*, 2006).

La cisticercosis es considerada una enfermedad importante en países desarrollados debido a la migración y presencia de trabajadores domésticos provenientes de países endémicos. Inmigrantes portadores de la tenia adulta y provenientes de estos países han demostrado ser los responsables de la dispersión de la enfermedad en países industrializados en los últimos años (Schantz *et al.*, 1992). Infecciones con la tenia continúan siendo comunes en países en desarrollo y constituyen un problema de salud pública ya que producen miles de huevos infectivos para humanos y cerdos, provocando enfermedades como la cisticercosis y neurocisticercosis (García *et al.*, 2003a). Esta última es causada en humanos cuando la larva se desarrolla en el sistema nervioso central (García *et al.*, 1999).

En un intento de interrumpir la transmisión, se han implementado varias medidas de control como por ejemplo: el tratamiento en masa de cerdos, la identificación y tratamiento de portadores de tenia, educación y mejoras sanitarias.

(González *et al.*, 2003; Sarti y Rajshekhar, 2003). Con esto se ha demostrado que la transmisión de la *Tenia solium* puede ser interrumpida temporalmente, pero la enfermedad logra recrudecer como consecuencia de la reintroducción de la tenia y la infección de nuevos cerdos sanos susceptibles. Por lo tanto, un programa efectivo de eliminación de *Tenia solium* deberá actuar frente a ambos estadios de desarrollo del parásito para interrumpir efectivamente el ciclo de la tenia, lo cual no se ha conseguido hasta la fecha (García *et al.*, 2003b, Sarti y Rajshekhar, 2003).

Una medida que está siendo considerada para ser añadida a las medidas de control mencionadas anteriormente, dentro de programas de control, es la vacunación en cerdos (Lightowers, 1999). Lightowers y otros han demostrado que el antígeno proveniente de la oncosfera, conocido como Tsol18, puede conferir protección cuando es administrada en dos dosis de 200µg. A pesar de que Tsol18 ha sido probada de ser una buena candidata para la vacuna de cisticercosis en cerdo, la producción de una esta vacuna recombinante es de un alto valor económico y por lo tanto poco práctica para su uso en larga escala.

Así mismo, otros estudios han considerado a enteropatógenos atenuados, como la salmonella, shigella, vibrio cholerae y listeria, buenos vectores para la entrega de antígenos heterólogos (Kotton y Hohmann, 2004). El uso de la salmonella como vector del antígeno vacunal, permitirá obtener una vacuna efectiva de menor costo, lo cual facilitaría el uso extensivo de esta vacuna por los criadores de cerdos.

Debido a esto se ha realizado el presente estudio con el objetivo de medir la respuesta inmune en cerdos, generada por una cepa atenuada de Salmonella entérica var typhimurium como vector para la entrega del antígeno vacunal Tsol18. Este busca ser un método de entrega seguro, efectivo y barato del antígeno vacunal y que pueda ser utilizada junto con las medidas de control existentes en programas de erradicación de la enfermedad.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CISTICERCOSIS

La cisticercosis es una enfermedad producida por el estadio larval del parásito *Taenia solium* (Flisser *et al.*, 2006). La *T. solium* presenta dos fases en su desarrollo: la fase adulta que se aloja en el intestino humano (conocida como solitaria) y la fase larvaria cuyo hospedero es el cerdo; pudiendo también encontrarse en el hombre. Estas dos fases juntas conforman el complejo Teniasis/Cisticercosis.

Ciclo biológico de *T. solium*

El ciclo de vida de *Taenia solium* consta de dos hospedadores, al hombre como hospedero definitivo y al cerdo como hospedero intermediario (Del Brutto, 1999). Sin embargo, eventualmente se ha encontrado la forma larvaria en el hombre, perros, gatos, ovejas, ciervos, camellos y monos (Acha y Szyfres, 2003) (Fig. 1). Los huevos de la tenia son eliminados en las heces de las personas infectadas con la tenia, contaminando así el medio ambiente.



Figura 1. Ciclo biológico de *Taenia solium* (Tomado de Flisser *et al.*, 2006).

En áreas donde los cerdos tienen acceso a los excrementos, estos ingieren los huevos presentes en las heces debido a la característica coprófaga del cerdo. Estos huevos pueden encontrarse dentro de los proglotitis o libres en las heces (Acha y Szyfres, 2003). Una vez que el cerdo ingiere los huevos de *Taenia solium*, estos llegan al intestino delgado y las oncosferas son liberadas en presencia de los ácidos biliares (Flisser, 1994). Las oncosferas una vez liberadas penetran la pared del intestino delgado y en el curso de 2 a 72 horas (Acha y Szyfres, 2003) migran por el torrente sanguíneo hasta llegar a los diferentes músculos y al sistema nervioso central, en donde se transforman en quistes larvales conocidos comúnmente como cisticercos (*Cysticercus cellulosae*). Estos quistes se desarrollan en un promedio de 9 a 10 semanas (Cordero de Campillo e Hidalgo-Argüello, 1999). El cisticercos puede alojarse en cualquier parte del cuerpo del cerdo, siendo los lugares más comunes la musculatura esquelética (García *et al.*, 2003b).

El humano, al ingerir carne porcina contaminada con cisticercos, desarrolla la *Taenia solium* en el intestino cerrando el ciclo de este parásito (Flisser *et al.*, 2006; Del Brutto, 1999). Una vez en el intestino, el cisticercos se libera de los tejidos que lo rodean y evagina su escólex. De esta manera se adhiere a la pared intestinal mediante ventosas

y ganchos. Luego de 62 a 72 días, el humano libera en las heces los proglotis grávidos conteniendo los huevos de la tenia, e iniciando nuevamente el ciclo de la *T. solium* (Acha y Szyfres, 2003).

El hombre puede llegar a desarrollar quistes luego de la ingestión de alimentos contaminados con huevos de *Taenia solium*. El contacto con personas portadoras de la tenia es uno de los mecanismos principales de infección. Adicionalmente, también se postula que los movimientos retroperistálticos intestinales inducidos por la tenia podrían permitir la llegada de algunos huevos al estómago, en donde por acción de los fluidos gástricos liberarían la oncosfera produciéndose así una autoinfección (Loo y Braude, 1982).

Historia y evolución

La cisticercosis ha existido desde la antigüedad y su nombre deriva de las palabras griegas “kystic” que significa vejiga y “kerkos” que significa cola, esto último haciendo referencia a la evaginación del quiste (Bryan, 1992). Desde las antiguas culturas de Egipto y Grecia se consideraba que la teniasis humana se debía a gusanos. Hipócrates, Aristóteles y Teofrasto los llamaban “gusanos planos” por su parecido con cintas, mientras que los romanos, Celso, Plinio el Viejo y Galeno, los llamaban *lumbricus latus*, que significa gusano ancho (Flisser, 2006).

El primer reporte histórico de cisticercosis en humanos es atribuido a Paranoli en 1550. Van Beneden demostró, en 1853, el desarrollo de cisticercos en cerdos cuando alimentó a un cerdo con huevos de *T. solium* y encontró numerosos cisticercos en los músculos después de la necropsia. La enfermedad no se identificó claramente como parasitaria hasta que Malpighi descubrió la naturaleza animal de estos quistes y describió el escólex en 1698 (Flisser, 2006).

El ciclo de vida de la *T. solium* ha sido entendido desde 1855, cuando se probó que la ingestión de los quistes obtenidos de cerdos infectados, desarrollaban a una tenia adulta en el intestino de los prisioneros. Dos años después en 1853, Van Beneden demostró que la ingestión de proglotis de *T. solium* provocaba cisticercosis en el cerdo (Willms y Sotelo, 2001). La clasificación genérica de *Cysticercus cellulosae* fue dada

por Zeder y Rudolphi, pero se desechó al demostrarse que los cisticercos son estadios larvarios de la tenia (Flisser, 2006).

En América Latina los primeros informes de la presencia de cisticercos en el sistema nervioso central en casos de autopsia fueron entre 1940 y 1970 (Flisser, 2006).

Características del parásito

Taenia solium

Taenia solium es un parásito plano, segmentado, hermafrodita que habita en el intestino delgado del hombre. Las tenias pueden vivir hasta 5 años en el intestino delgado del hombre (García *et al.*, 2003a). La tenia adulta mide entre 2 a 4m de longitud y se encuentra dividida en tres secciones. La primera es el escólex o cabeza que tiene forma globular de 1 mm de diámetro. En este se observa una doble corona de ganchos denominada rostelo y cuatro ventosas que le sirven como órganos de fijación (Fig. 2). La segunda sección es el cuello que consta solo de unos 5 a 10 mm de longitud (Náquira, 1999).

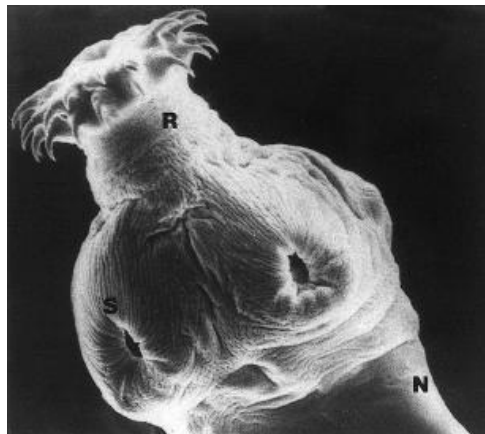


Figura 2. Escólex de *Taenia solium* (Tomado de: Sciutto *et al.*, 2000).

La última sección es el estróbilo o cuerpo que constituye la parte más larga del parásito formado por 800 a 1000 segmentos denominados proglotis. Estos segmentos se encuentran separados por constricciones transversales que varían de forma y tamaño.

Existen tres tipos de proglotis: inmaduros, maduros y grávidos. Los grávidos, grandes y anchos, se encuentran más alejados del escólex y desarrollan entre sí los aparatos reproductores de la tenia, los cuales acumulan en su interior miles de huevos (Soulsby, 1987).

La tenia adulta elimina entre cinco a seis proglotis grávidos cada dos a tres días, desprendiéndose del extremo distal del estróbilo y luego eliminados con las heces (Del Brutto, 1999). Cada proglotis contiene entre 30000 a 50000 huevos que son eliminados por un poro en la parte anterior del proglotis (Pawlowski, 2002). Los huevos que se encuentran en los proglotis grávidos son liberados y expulsados del organismo por las heces, pudiendo encontrar huevos libres en ellas.

Oncósfera

Los úteros de la tenia contienen grandes cantidades de huevos (Fig. 3). Los huevos miden entre 26 y 34 μ m de diámetro. Dentro de cada huevo se encuentra un embrión hexacanto u oncósfera, la cual está armada con tres pares de ganchos (Soulsby, 1987). La oncósfera está cubierta por tres envolturas embrionarias: la cápsula, la cubierta interna y la membrana de la oncósfera; de las cuales la cubierta interna, compuesta por el embrióforo es la principal y la más resistente. Esta protege a la oncósfera de las condiciones ambientales desfavorables (Pawlowski, 2002; Willms *et al.*, 2006).

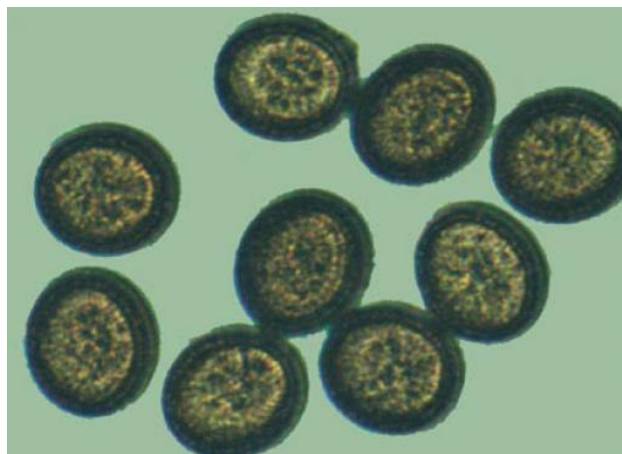


Figura 3. Huevos conteniendo oncósferas de *T. Solium* (Tomado de Flisser *et al.*, 2006).

Cysticercus cellulosae

El cisticerco de *Taenia solium* es una vesícula ovoidea de 5 x 8-10 mm. Dentro de este, se encuentra el escólex invaginado de la tenia adulta y un líquido de aspecto acuoso y transparente (Acha y Szyfres, 2003) (Fig. 4). Al igual que la tenia adulta, el escólex del cisticerco posee cuatro ventosas y un rostelo armado con dos hileras de ganchos (Willms *et al.*, 2006).

El quiste consta de tres capas: cuticular, celular y reticular (Del Brutto, 1999). La membrana cuticular o externa cumple las funciones de protección, absorción y excreción de metabolitos (Pawlowski, 2002).

a)



b)



Figura 4. a) Cisticercos de *Taenia solium* (Tomado de Flisser *et al.*, 2006). b) Cisticercos en musculatura (Tomado de: García *et al.*, 2005).

Los cisticercos se desarrollan en cuatro etapas principales (Fleury *et al.*, 2006). La primera etapa consta de un quiste vesicular lleno de un líquido transparente donde se encuentra la larva, de 4 a 5 mm, invaginada. La membrana del quiste es delgada, friable y transparente. En la etapa coloidal se observa al quiste adherido y usualmente rodeado de cápsula conectiva secundaria. El líquido en su interior pierde fluidez y adquiere aspecto lechoso y poco fluido con consistencia gelatinoide. Microscópicamente se ve que tanto la membrana propia como la cápsula se encuentran hialinizadas con mineralización temprana.

La tercera etapa es llamada nodular granular. El quiste de menor tamaño posee una membrana adherida a la capsula de colágeno secundaria. El contenido es granuloso

lo que impide la visualización del escólex. Finalmente, el cisticerco llega a la etapa nodular calcificada, en la cual el quiste es un nódulo endurecido, calcificado y reducido a menos de la mitad de su tamaño original (Fleury *et al.*, 2006).

Todos los cisticercos se degeneran con el tiempo, volviéndose necróticos y eventualmente se calcifican o forman un granuloma, que finalmente se transforma en una cicatriz (Pawlowski, 2002). El tejido del parásito muerto es reabsorbido lentamente, dejando una concreción calcificada, tanto en músculo como en cerebro (Willms y Sotelo, 2001).

En el cerdo, una vez instalado el cisticerco, permanece en su forma vesicular por tiempos variables que dependen, en primer lugar, de la cantidad de metacéstodos presentes y quizás también del estado de nutrición del animal. En animales experimentalmente infectados, con buena alimentación, estas formas vesiculares se transforman ya después de tres o cuatro meses en metacéstodos coloidales, y a los ocho meses la mayoría se encuentran en forma caseosa (Fleury *et al.*, 2006).

Un tipo particular de cisticerco es el cisticerco racemoso. Este se asemeja a un racimo de uvas. Puede llegar a medir hasta 10 cm y generalmente carece de escólex. Contiene varios mililitros de líquido y se encuentra generalmente en cavidades ventriculares y en las cisternas del líquido cefalorraquídeo (LCR), localizada en la base del cráneo (Náquira, 1999).

Importancia en la Salud Pública

Teniasis

La presencia de *Taenia solium* en el cerdo y el hombre, es un indicador de bajos estándares de salud y condiciones sanitarias deficientes (Harrison *et al.*, 1999). En áreas rurales pobres, donde la crianza de cerdos es libre y con escasa o nula sanidad, se permite el establecimiento del ciclo de la *T. solium*. Al comercializar y exportar estos animales a comunidades urbanas, el consumo de estos resulta en infecciones de tenia, las cuales sirven como una fuente de cisticercosis humana (Flisser *et al.*, 2006).

Dentro del ciclo de vida del parásito, se ha demostrado la asociación entre la presencia de portadores de tenia, cisticercosis porcina y personas seropositivas, por lo tanto se sabe que la presencia de un portador de tenia en una casa, es un factor de riesgo para adquirir la neurocisticercosis humana y la cisticercosis porcina (Flisser *et al.*, 2003). La mayor importancia de la teniasis es que los portadores de tenias adultas expulsan miles de huevos microscópicos infectantes en sus heces y ante la falta de condiciones sanitarias, estos huevos llegan al ambiente, contaminando el suelo, agua, vegetales, etc. (Sánchez, 2008).

En Asia, un estimado anual de las pérdidas económicas asociadas a la teniasis en Taiwán, Corea e Indonesia, son de 18 millones, 13 millones y 2.4 millones de dólares respectivamente (Rajshekhar *et al.*, 2003).

Cisticercosis

La importancia en la salud pública radica en la enfermedad producida en el hombre cuando accidentalmente ingiere huevos de *Taenia solium*. El hombre al ingerir los huevos desarrolla cisticercos, los mismos que se ubican principalmente en la musculatura, tejido subcutáneo y sistema nervioso central (Fig. 5).

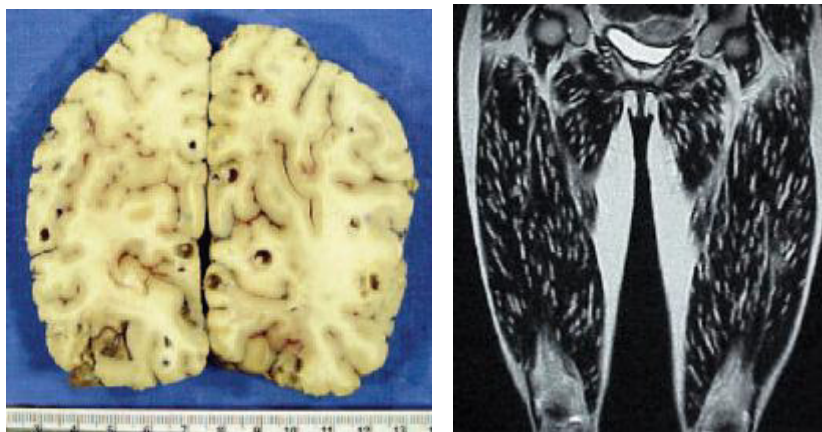


Figura 5. a) Cerebro humano con cisticercosis parenquimatosa (Tomado de: Fleury *et al.*, 2006). b) Presencia de quistes en musculatura (Tomado de: Garcia *et al.*, 2003b).

Cuando los quistes desarrollan a nivel del sistema nervioso central, se desencadena un desorden neurológico conocido como neurocisticercosis (Flisser, 1988). La degeneración de estos quistes provoca una respuesta inflamatoria local, generando manifestaciones clínicas, como epilepsias, migrañas, nistagmo, entre otras (García *et al.*, 1999).

La cisticercosis produce grandes pérdidas económicas tanto en el tratamiento de la neurocisticercosis en el hombre como en la producción porcina. Sin embargo, el estimar el impacto económico global de la enfermedad es difícil debido a la inadecuada información sobre la prevalencia y los parámetros económicos relativos a dicha enfermedad (González, 1993). Sin embargo, se han obtenido valores relacionados que nos permiten entender la importancia de la enfermedad.

En zonas del país con mayor nivel de crianza y comercialización de cerdos, más del 1% de la población humana es portadora de *Taenia solium* o *T. saginata*, mientras que más del 20% de cerdos desarrolla la cisticercosis (González *et al.*, 1990).

La neurocisticercosis en el hombre y su tiempo de evolución conlleva a la hospitalización por largos periodos, así como la incapacidad física y psíquica que produce en estos pacientes (OPS/OMS, 1993). En México, se ha estimado que el cuidado médico de un paciente con neurocisticercosis cuesta más de US\$ 2.000. En este mismo país, también se calculó que el costo del tratamiento y hospitalización de los pacientes con neurocisticercosis es de alrededor de 20 millones de dólares americanos anuales (Flisser, 1988).

Así mismo, la cisticercosis porcina, genera también pérdidas en la producción porcina. El impacto económico de la cisticercosis porcina sólo ha sido calculado en pocos países, ya que en muchos casos no se tiene una adecuada información sobre la prevalencia real de la infección (González, 1993). Sin embargo, se sabe que en el Perú, la crianza de cerdos es una parte importante en la economía, principalmente en la sierra y selva del país y *T. solium* produce grandes pérdidas económicas en la producción a los criadores (CWGP, 1993).

A pesar de que la cisticercosis porcina no produce sintomatología, una carcasa infectada solo cuesta un tercio del precio que costaría una carcasa sana y en ocasiones la carne es decomisada (CWGP, 1993). La Organización Mundial de la Salud (WHO), implementó una política en la que los cerdos detectados positivos a cisticercosis deben ser confiscados sin realizar pago alguno a los propietarios. Esta situación ha permitido la creación y desarrollo de camales y mercados clandestinos en los cuales se comercia a los cerdos infectados con *T. solium* (González *et al.*, 2003). En el Perú, aproximadamente el 55% de los cerdos son beneficiados ilegalmente, cifra que puede llegar cerca al 100% en poblaciones rurales (CWGP, 1993).

Las pérdidas económicas por el decomiso de reses bovinas y porcinas infectadas por cisticercosis pueden ser apreciables. En 1963, en 6 mataderos de América Central y Panamá, la cisticercosis causó el 68% del total de decomisos, con una pérdida estimada en medio millón de dólares americanos, mientras que en México, durante 1980, se decomisaron 264,000 canales porcinas y las pérdidas totales se estimaron en más de 43 millones de dólares americanos (Acha y Syfres, 2003).

En el Perú, se demostró que de las 65,000 TM de carne de porcino que se consumieron en 1987, el 55% provenía de la matanza clandestina y de éstos el 40% (11,700 TM) estaba infectado con cisticercosis. A partir de estos datos y considerando que la carne infectada pierde de un tercio a la totalidad de su valor, se puede calcular que existe una pérdida de más de 5 millones de dólares anuales por causa de la cisticercosis (CWGP, 1993).

Diagnóstico y tratamiento

Teniasis

El diagnóstico de la teniasis intestinal en humanos se realiza mediante el análisis del material parasitario en las heces, detectando moléculas específicas (proglotis, escólex o huevos) de tenias en muestras fecales (Allan *et al.*, 1996). Se debe tener presente que el análisis de los huevos no va a permitir diferenciar entre especies de tenia (Allan, 1999). Para determinar la especie del gusano es necesario tratar al paciente con niclosamida o prazicuantel y colectar la tenia adulta para una diferenciación

morfológica, mediante la presencia de ganchos en el escólex en el caso de la *T. solium* (Lee A y Engels D, 2006).

Esta técnica tiene la limitación de que la excreción de los elementos parasitarios es intermitente, e incluso ausente durante los tres primeros meses de la infección. Así mismo, el uso de fármacos cestocidas que provocan la desintegración de la parte proximal del gusano y la pérdida del escólex, dificultarían la identificación (Allan, 1999).

En la actualidad se ha desarrollado un ensayo diagnóstico para la detección de teniasis llamado ELISA de detección de coproantígeno. Esta prueba tiene aproximadamente 100% de sensibilidad y no tiene reacción cruzada con materia fecal de individuos saludables o con otros parásitos, convirtiéndose así en el mejor ensayo a elegir. Sin embargo, no permite diferenciar entre *T. solium* y *T. saginata* ya que pertenecen a un mismo género (Allan, 1999).

Posteriormente se diseñó una prueba de ELISA tipo dipstick, la cual permite realizar la prueba sin necesidad de un laboratorio (Flisser *et al.*, 1999). Esta es una prueba simple y apropiada para estudios epidemiológicos (Allan *et al.*, 1996). Además, se está investigando para el desarrollo de una prueba que utilice anticuerpos monoclonales y así incrementar la sensibilidad de la prueba y lograr la diferenciación de las infecciones por *T. solium* y *T. saginata* (Allan, 1999).

Dentro del desarrollo de pruebas moleculares para la detección de la teniasis encontramos a la reacción de cadena de la polimerasa (PCR), la cual utiliza primers de oligonucleótidos derivados de pruebas DNA especie-específicas (González *et al.*, 1999). Dentro de las variantes de PCR se tiene al PCR multiplex. Esta es una prueba fácil y rápida para ser usada en heces y parásitos, no requiere secuenciar DNA y permite la diferenciación entre especies de tenia usando una combinación de diferentes pares de primers en la misma reacción de amplificación para producir secuencias especie-específicas de DNA mitocondrial que puedan ser distinguidas (González *et al.*, 2003).

Otra técnica molecular es el RFLP (PCR coupled to restriction fragment length polymorphism), que al igual que el PCR mutiplex, permite el diagnóstico diferencial

entre especies de tenias sin tener la necesidad de obtener proglotis grávidos o maduros intactos (Lee A y Engels D, 2006).

Dentro de las pruebas serológicas, encontramos al EITB. Esta prueba es altamente sensible (95%) y específica (100%) (Wilkins *et al.*, 1999). Sin embargo, posee la desventaja de dar falsos positivos al enfrentarse a personas con historia de infección de *Taenia solium*. Esto debido a que la prueba detecta anticuerpos, los cuales podrían presentarse en una persona con una infección no activa (Lee A y Engels D, 2006). La combinación de EITB-T y el ELISA de copro-antígeno, sería la forma específica de detectar a los portadores de *T. solium*, sin tener la necesidad de coleccionar e identificar las tenias del portador (Lee A y Engels D, 2006).

En la actualidad existen dos drogas disponibles para el tratamiento de la teniasis: niclosamida y prazicuantel (García *et al.*, 2003b). El prazicuantel tiene el pequeño riesgo de que los quistes viables en cerebro sean afectados, provocando la presentación de sintomatología nerviosa. La dosis oral es de 2g de niclosamida y de 5-10 de prazicuantel, ambas en dosis únicas (García *et al.*, 2005). Ambos fármacos poseen una efectividad mayor al 95%, sin embargo los cestodos que no son expelidos, pueden producir nuevos proglotis a partir del cuello formando una tenia entera en dos meses.

Cisticercosis

Dentro de las técnicas para diagnosticar la cisticercosis en cerdos encontramos a la visualización de los quistes en la canal mediante su inspección. Esta es la técnica más fiable y la “gold estandar”. La limitante de esta es que supone el sacrificio de los animales. Para esto se realiza cortes en los músculos y vísceras en busca de cisticercos.

La inspección de la canal se realiza mayormente en camales. Sin embargo, los datos que nos brinda esta técnica pueden no ser tan reales, debido a que puede ser que haya muy pocos quistes en la canal y estos pasen desapercibidos. Así también, pueden dar datos falsos de prevalencia ya que muchos animales no son llevados a los camales autorizados, los cuales son sacrificados en camales clandestinos o en el traspatio de la misma casa (González *et al.*, 1990).

Así mismo, para fines de investigación epidemiológica se realiza la necropsia de la canal (González *et al.*, 1999). Este es un método más minucioso que la inspección de la canal, en donde la revisión es muy minuciosa en busca de la larva de *T. solium* y requiere la divulsión delicada de todos los músculos (González *et al.*, 1990) cerebro y vísceras.

Una técnica desarrollada para detectar la cisticercosis en campo es el examen de lengua. Este examen se realiza comúnmente en zonas donde existe la enfermedad y se utiliza para discriminar la presencia de cisticercosis en cerdos, previo a una transacción comercial. Este examen consiste en la palpación de los nódulos y/o identificación visual de los cisticercos. Para ello, se sujeta al animal, se introduce un palo en forma transversal en el hocico para mantenerlo abierto y se jala la lengua para la visualización y palpación de los cisticercos (Falcón, 2006). Este método tiene un 87% de sensibilidad y 99% de especificidad (González, 1993).

Este método es fácil de aprender y es de gran utilidad como método de evaluación en países endémicos (González, 1993). Sin embargo, requiere un entrenamiento previo para el personal que lo realiza, requiere tiempo para realizarlo, los quistes pueden ser reventados intencionalmente para incrementar el valor del cerdo y supone el riesgo de ser mordido por el animal (González *et al.*, 1999).

Para el diagnóstico serológico de la cisticercosis se han desarrollado varias pruebas (fijación del complemento, inmunoelectroforesis, ELISA y EITB). Dentro de estas, la prueba más idónea para el diagnóstico de la enfermedad es la prueba de electroinmuno transfer blot (EITB) (llamada también “Western blot”) (Flisser *et al.*, 1999). Esta prueba posee 98% de sensibilidad y 100% de especificidad (González, 1993). Esta técnica desarrollada por Tsang (1989) identifica siete bandas glicoproteicas (GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14, y GP13) en una reacción similar al ELISA. Esta es la prueba de elección para la detección de anticuerpos contra cisticercosis tanto en el cerdo como en el humano y denominada prueba Gold estándar en el diagnóstico serológico de la enfermedad (García *et al.*, 2005).

Sin embargo, a pesar de que evita el desarrollo de reacciones cruzadas (Flisser *et al.*, 1999), el uso de EITB no permite diferenciar animales vacunados de no vacunados

(Arriola, 2004). Es decir, la prueba permite detectar la exposición a huevos de *T. solium* más que infección, por lo que se debe tener cuidado en su interpretación, ya que un animal positivo no necesariamente indica una infección con parásitos vivos (Harrison *et al.*, 1999). A partir de este punto las investigaciones se han dirigido a detectar antígeno del estadio larvario a fin de comprobar el desarrollo de infección viable en los cerdos (Falcón, 2006).

Las pruebas diagnósticas para la detección de la cisticercosis en el hombre se pueden clasificar en dos grupos, las serológicas y las basadas en imágenes. En el primer grupo podemos encontrar a las pruebas de reacciones de fijación del complemento, ELISA y el inmunoblot (EITB) (Flisser *et al.*, 1999).

Al igual que en el diagnóstico de la cisticercosis porcina, el EITB es la prueba más fidedigna a ser utilizada y ha sido considerada como la prueba “gold Standard” desde 1989 (García *et al.*, 2005). Esta prueba cuenta con una alta sensibilidad y especificidad (Tsang *et al.*, 1989). Esta prueba nos indica que el paciente posee la tenia o cisticercosis muscular, sin embargo no es una prueba confirmatoria de neurocisticercosis (Del Brutto, 1999). Para el diagnóstico de la neurocisticercosis se utilizan las pruebas basadas en imágenes.

Los cisticercos pueden detectarse mediante exámenes simples como oftalmológico (de ubicarse en el globo ocular) radiografías simples o incluso en la palpación. Sin embargo, no todos los nódulos subcutáneos palpables son cisticercos (Del Brutto, 1999). Así mismo, las manifestaciones clínicas son inespecíficas, los hallazgos radiológicos no son patognomónicos y algunos tests serológicos tienen poca sensibilidad o especificidad (Enseñat *et al.*, 2007), por lo que la interpretación correcta de los exámenes de neuroimagen junto con pruebas inmunológicas permitirían un correcto diagnóstico de la cisticercosis.

Las dos principales pruebas de imágenes utilizadas son la Tomografía Computarizada (TC) y la Resonancia Magnética (RM). Estas permiten visualizar el número y localización de los cisticercos así como el estadio evolutivo en el que se encuentran (Del Brutto, 1999). La RM cerebral es mejor para mostrar quistes intraventriculares o subaracnoideos, y para mostrar inflamación alrededor de un quiste,

mientras que la TC es mejor para mostrar la calcificación de lesiones inactivas (Herrera, 1999).

Oxfendazol ha demostrado su eficacia contra la cisticercosis porcina en un esquema de dosis simple de 30mg/KPV, así como su superioridad al prazicuantel y albendazole, así como otras importantes características (González *et al.*, 2003). Porcinos tratados con oxfendazole son protegidos de infecciones posteriores por un período de tres meses, ya que produce el bloqueo del ciclo biológico del parásito por este periodo, activando el sistema inmune que evita la reinfección durante este periodo (González *et al.*, 2001). El tratamiento de la población porcina con oxfendazole fue considerado impráctico debido a su costo y a la necesidad de múltiples tratamientos (González *et al.*, 2003). También presenta efectos secundarios y la carne ya no es apta para el consumo (González *et al.*, 1999). Los quistes mueren mínimo cuatro semanas después del tratamiento con Oxfendazol (González *et al.*, 1998). En caso se desee consumir la carne se debe esperar ocho o más semanas para que solo se observe unas pequeñas cicatrices y la carne se encuentre apta para el consumo (González *et al.*, 1999).

El oxfendazole tiene la desventaja de no atravesar la barrera hemato-encefálica, por lo cual no es capaz de eliminar a los quistes que se encuentren en el cerebro (González *et al.*, 1996). Así mismo, otra desventaja es que los animales tratados con Oxfendazole siguen saliendo positivos a la prueba de EITB, debido a que esta prueba detecta anticuerpos circulantes contra *T. solium* (González *et al.*, 1998).

El tratamiento de la neurocisticercosis en humanos es principalmente sintomático, aunque también se cuenta con tratamientos anticestocidas y quirúrgicos, los cuales son utilizados solamente en ciertas condiciones.

El tratamiento sintomático se dará de acuerdo al síndrome clínico, el grado de discapacidad neurológica, número, localización y viabilidad de los quistes, y la respuesta inmune del hospedador (Takayanagui y Odashima, 2005). Este incluye drogas anti-epilépticas y anti-inflamatorias (García *et al.*, 2005). La administración de drogas como fenitoína o carbamazepina son las más adecuadas para el control de los ataques epilépticos, mientras que los corticosteroides son los antiinflamatorios de primera elección para la terapia de meningitis, encefalitis cisticercosa y angitis. La

dexametasona y prednisona son los utilizados frecuentemente (Takayanagui y Odashima, 2005).

Existen casos en los que el tratamiento cestocida puede generar problemas secundarios como aumento de edema cerebral y aumento de presión intracraneal. Igualmente en pacientes con presencia de quistes calcificados no se recomienda el tratamiento ya que esto indica que los quistes han sido destruido previamente por el sistema inmune (Takayanagui y Odashima, 2005). En caso se recomiende una terapia anti-cestocida, el medicamento a elección es el Albendazole en una dosis de 15 mg/Kg./día dividido en dos dosis cada 12 horas por 8 días (Takayanagui y Odashima, 2005).

El tratamiento quirúrgico busca controlar la hipertensión intracraneana cuando su presencia es de prioridad crucial (García *et al.*, 2005). Esta técnica no está al alcance de países en desarrollo, donde es mayor la enfermedad, debido al alto costo del procedimiento y la necesidad de personal altamente calificado (Pal *et al.*, 2000).

Epidemiología de la teniasis y cisticercosis

T. solium es prevalente en América latina (Flisser *et al.*, 2003), África (Carabin *et al.*, 2006; Phiri *et al.*, 2003) y Asia (Rajshekhar *et al.*, 2003), donde se desarrolla el ciclo completo, afectando a la salud pública y la economía de los países (Sciutto *et al.*, 2000). El hombre es el único portador conocido de la tenia adulta, con pocas o ninguna manifestación clínica (García *et al.*, 2006).

La teniasis humana constituye un problema de salud pública que afecta no sólo a áreas endémicas. Debido a la migración de portadores de tenia de zonas endémicas a no endémicas, el número de casos en estas últimas puede ir en aumento.

Esta parasitosis se presenta principalmente en lugares cuya falta de infraestructura sanitaria e inadecuado manejo de excretas humanas, generan las condiciones propicias para que se cierre el ciclo biológico de la tenia (García *et al.*, 2003b; Acha y Szyfres, 2003). El fecalismo al aire libre, la ignorancia, la pobreza y

ciertas condiciones ambientales favorecen la transmisión de la infección (González, 1993).

Esto se puede observar en países en desarrollo y de bajos niveles educacionales como en algunos países de latinoamérica, los cuales presentan los registros de prevalencias más altas (Acha y Szyfres, 2003; Reyes, 1994). Del mismo modo, la morbilidad y mortalidad humana por *Taenia solium* es particularmente severa en países de latinoamérica como partes de África y Asia.

Otro factor importante para el desarrollo de la teniasis en el humano es la escasa inspección sanitaria y consumo de carne de cerdo poco o mal cocida (García *et al.*, 2006). Así mismo, la inspección no detecta niveles reales de infección ya que cerdos infectados no son llevados a mataderos oficiales o los métodos de detección utilizados en los mataderos son inapropiados, siendo así, que en nuestro país aproximadamente el 65 % de cerdos consumidos provienen de camales clandestinos donde no se lleva a cabo ni un control (González *et al.*, 1999).

La distribución de la cisticercosis porcina es mundial y la distribución de la infección coincide con la de la tenia adulta (Acha y Szyfres, 2003). La distribución epidemiológica de la cisticercosis ha sido estudiada con profundidad en el Perú. Estudios serológicos realizados en diferentes regiones nos muestran una seroprevalencia de cisticercosis porcina variable, que abarca desde zonas endémicas de baja prevalencia hasta áreas hiperendémicas.

En los países en vías de desarrollo, especialmente de América Latina, la crianza de cerdos en traspatio constituye una importante fuente de alimento y una fuente de ingreso inmediata para pobladores de áreas rurales (Pawlowski, 2002). En regiones endémicas, se considera que más del 30% de los cerdos pueden estar infectados (González *et al.*, 1999). La enfermedad se encuentra casi ausente en países industrializados, donde el cerdo es criado con prácticas modernas de explotación intensiva y sin acceso a las heces humanas (Acha y Szyfres, 2003). Sin embargo, esta situación está variando debido a la migración de personas infectadas de áreas endémicas a áreas libres (Schantz *et al.*, 1992).

Los principales factores de riesgo relacionados con la infección de los cerdos son el acceso a heces humanas, la ausencia de letrinas y la disposición de excretas en los alrededores de la casa de un criador de cerdos (González *et al.*, 1999). Así mismo, la cisticercosis en el cerdo causa grandes pérdidas económicas en la producción porcina a consecuencia del decomiso de la carne infectada (Flisser *et al.*, 2006).

El hombre puede adquirir la cisticercosis accidentalmente por ingestión de huevos de *Taenia*. Esta situación se puede dar por el consumo de alimentos (verduras o frutas) o agua contaminada con huevos de tenia, así también por la manipulación de alimentos con manos contaminadas. El desarrollo de los quistes en el hombre se produce de la misma manera que en el cerdo y se conoce que el tropismo de *T. solium* por el sistema nervioso central de humanos es más frecuente en América Latina (Sciutto *et al.*, 2000). Siendo mayor la presentación subcutánea en países asiáticos.

Los quistes se alojan frecuentemente en el parénquima cerebral y son más comunes que los alojados en los ventrículos o en el espacio subaracnoideo (García *et al.*, 2005). Así mismo se pueden encontrar cisticercos en el globo ocular, músculos esqueléticos o el tejido celular subcutáneo (Del Brutto, 1999).

El principal factor de riesgo para la presentación de la cisticercosis en el hombre es la presencia de portadores de la forma adulta de *T. solium* en los hogares (De Lourdes *et al.*, 1999). Se han reportado casos de cisticercosis en países desarrollados debido a las migraciones desde áreas endémicas (Scharf, 1988), presencia de inmigrantes portadores de la tenia que manejan alimentos (Cuetter *et al.*, 1992) o personas que se infectaron haciendo turismo al viajar a países endémicos (Chatel *et al.*, 1999).

El hombre tiene dos formas principales de contraer la infección: auto-infección externa y la auto-infección interna (Pawlowski, 2002). La auto-infección externa implica la infección fecal-oral con huevos de *T. solium* en un individuo con teniasis intestinal y la auto-infección interna implica una infección con huevos a través de retro-peristaltismo (Pawlowski, 2002).

Control del complejo teniasis-cisticercosis

The International Task Force For Disease Eradication declaró en 1993 a la infección por *Taenia solium* como una infección potencialmente erradicable (CDC, 1993). Se han desarrollado diferentes estrategias de control para la cisticercosis, sin conseguirla eficientemente (Gonzalez *et al.*, 2003).

Factores que van de mano con la eliminación incluyen mejoras en la economía y sanitación, control de crianza y rigurosa inspección cárnica (Schantz, 2006). El control de la transmisión de esta enfermedad ha mostrado mejoras mediante avances en la sanitación pública, especialmente con la implementación de letrinas en áreas endémicas donde carecen servicios higiénicos adecuados (García *et al.*, 2003a).

La eliminación efectiva del parásito requiere una presión substancial del parásito tanto en el humano como en el hospedero porcino (Schantz, 2006). En nuestro país se ha iniciado un programa regional en un área altamente endémica para evaluar estrategias de intervención, como tratamientos masivos o específicos con tenicidas, tratamiento “cisticercida” en humanos y vacunaciones en humanos y cerdos (Schantz, 2006).

Las estrategias de intervención según Lightowlers, 1999, son:

- Quimioterapia en portadores de tenia
- Quimioterapia en cerdos infectados
- Educación pública
- Vacunación de cerdos

El uso de quimioterapia, tanto en humanos como en cerdos, disminuye la presencia del parásito sólo por un periodo de tiempo. El uso tanto de Praziquantel en humanos como de Oxfendazol en cerdos ha demostrado ser muy efectivo para atacar a la fase adulta y al estadio larvario respectivamente (González *et al.*, 1999). Sin embargo los efectos de este tratamiento solo duraron 2 años después de la intervención (García *et al.*, 2006). Se ha determinado que este método, requiere una cobertura de por lo menos el 90% de la población (García *et al.*, 2006), y su aplicación tiene que ser continua o en

ciclos, para poder reducir la cantidad de tiempo necesario para lograr la eliminación del parásito (García *et al.*, 2003a).

Así mismo, la vacunación es un método potencial para el control de esta enfermedad (Flisser *et al.*, 2004). El desarrollo de una vacuna que elimine la fuente de infección de la taenia en el humano, rompería el ciclo biológico del parásito y así mismo eliminaría el agente causal de la neurocisticercosis humana (Flisser *et al.*, 2004). El utilizar una vacuna altamente eficaz en cerdos, junto con tratamiento en humanos portadores de tenia, es una fuerte opción para la erradicación de cisticercosis (Lightowers, 1999).

En la actualidad se sabe que componentes proteicos presentes en los huevos de tenia (oncósferas) son una fuente de antígenos protectores. Se han identificado antígenos protectivos y efectivos en la prevención de teniasis en ovejas y vacunos. Tsol18 y Tsol45 son los antígenos protectivos homólogos de *T. solium* que han sido identificados, recombinados y expresados en *E. coli* (González *et al.*, 2005).

VACUNA CONTRA LA CISTICERCOSIS PORCINA

El potencial de una vacuna para el control de la cisticercosis porcina ha sido descrito en el pasado (Flisser y Lightowers, 2001). Para el desarrollo de esta vacuna se debe considerar que la cisticercosis porcina es una zoonosis en la cual los usuarios de la vacuna son pobladores de villas rurales endémicas. Un alto precio en la vacuna sería indudablemente un impedimento para el uso de la estrategia vacunal (González *et al.*, 2003). Por lo tanto, la vacuna contra la cisticercosis deberá ser barata, con largo periodo de protección y deberá ser fácil de administrar en una campaña de intervención en masa (Sarti y Rajshekhar, 2003).

Vacunas parasitarias

La búsqueda del desarrollo de vacunas contra parásitos ha sido de lento desarrollo debido a las diversas dificultades que se presentan por las características de estos organismos. Entre estas dificultades se encuentran la posibilidad del cultivo in

vivo e in vitro de los organismos, la complejidad de la organización multicelular, los diversos estados de desarrollo, su variabilidad antigénica (Higashi, 1988; WHO, 2001). Así mismo, problemas como el desarrollo de la resistencia a fármacos, toxicidad de estos, trabas financieras y dificultades operacionales han contribuido a un lento avance hacia un control efectivo de las enfermedades parasitarias (Higashi, 1988).

Sin embargo, los avances obtenidos en la separación de proteínas, tecnología de hibridomas, producción de anticuerpos monoclonales y la tecnología de DNA recombinante ha ayudado en la identificación de parásitos y en la producción de vacunas candidatas definidas molecularmente (Higashi, 1988).

A pesar de los progresos obtenidos en las últimas décadas, en clonación y expresión de antígenos protectivos de un gran número de protozoos y helmintos, el prospecto de usar estos antígenos para el desarrollo de vacunas que prevengan la infección ha sido tomado con poco entusiasmo de los fabricantes a nivel industrial debido al escepticismo de la capacidad de que antígenos definidos puedan provocar inmunidad ante organismos tan complejos (WHO, 2011).

Felizmente, estos avances científicos y técnicos obtenidos en los últimos años también han hecho que otro número de grupos apoyen la investigación en el desarrollo de vacunas contra enfermedades parasitarias. Así, a pesar del éxito de la vacuna, cada prueba nueva brinda nueva información con respecto a las respuestas inmunes necesarias para la protección (Price y Kieny, 2011). De esta manera se han logrado avances importantes en el desarrollo de vacunas contra enfermedades parasitarias como Malaria y leishmaniasis en los últimos cinco años (WHO, 2011).

Vacunas recombinantes

Una vacuna recombinante es una vacuna que ha sido obtenida utilizando la tecnología del ADN recombinante en alguna etapa de su producción. Mediante esta tecnología se puede escindir e introducir fragmentos de ADN en regiones cromosomales con suma precisión. Los nuevos avances en el diseño de vacunas, incluyen tecnologías

como vacunas de subunidades recombinantes, variadas vacunas virales, vectores virales vivos, vacunas conjugadas y vacunas DNA (Minichiello, 2002).

Las técnicas de ADN recombinante son usadas para clonar secuencias de ADN que codifican antígenos de nuestra elección, dentro de plásmidos expresados en células eucariotas, los cuales son fácil y económicamente amplificados en una bacteria y recuperados posteriormente con un alto nivel de pureza (Minichiello, 2002). Las bacterias recombinantes portadoras de vectores tienen por estrategia general expresar antígenos protectores en un vector replicativo. Se conocen vectores virales y bacterianos, entre estos últimos encontramos a la Salmonella, Brucella, BCG (Shata *et al.*, 2000).

Los plásmidos, moléculas circulares de ADN que se replican de manera independiente al cromosoma de la célula hospedera, pueden ser manipulados en el laboratorio para formar una molécula recombinante que es capaz de reproducirse en el hospedero y codificar una proteína. Un plásmido recombinante contiene un fragmento de ADN foráneo insertado (Minichiello, 2002). Los plásmidos son entregados introduciéndolos dentro de vectores virales y posteriormente infectando a un individuo con este vector viral. El plásmido será transcrito y traducido para producir productos proteicos (Minichiello, 2002)

Las cepas bacteriales atenuadas no solo ofrecen un gran potencial como vacunas contra enfermedades homólogas, si no también ante patógenos heterólogos mediante la incorporación de antígenos foráneos en estas cepas vacunales (Genstchev *et al.*, 2001).

Dos razones importantes para el desarrollo de vacunas vectoriales de bacterias vivas son la posibilidad de dosificación oral y la protección a mucosas (Kotton y Hohmann, 2004). Así también, no necesitan almacenamiento especial o refrigeración, poseen un considerable efecto sobre el sistema inmune siendo capaz de estimular respuesta humoral como celular. Esta respuesta se mantiene viva por mayor tiempo y no siempre es necesario utilizar segundas dosis (refuerzos). Así mismo, el costo de producción de esta vacuna es mínimo y altamente estable (Minichiello, 2002). Sin embargo, esta tecnología solo permite el diseño de vacunas que codifiquen antígenos proteicos y no así carbohidratos u otro tipo de antígeno (Minichiello, 2002).

Antígeno vacunal de cisticercosis (Tsol 18)

Dentro de los antígenos parasitarios tenemos que los antígenos totales de un parásito consisten en un extracto total de membranas y escólex y el líquido vesicular. Estos son los antígenos más extensamente empleados en la detección de infecciones parasitarias. Estos antígenos han sido caracterizados por inmunoelectroforesis (IEF) y por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Rivera A, 2006). Se ha observado que algunos componentes de estos antígenos son compartidos por varias tenias y son los causantes de las reacciones cruzadas (Rivera A, 2006).

Por otro lado, se conocen antígenos estadio-específicos como los componentes proteicos presentes en los huevos del parásito (conocidos como oncósferas). Estos son una fuente de antígenos protectores. La inmunidad del estadio de oncósfera juega un rol central en la transmisión de los céstodes de tenia y vacunas basadas en esta etapa, han sido altamente protectivos para *T. ovis*, *E. granulosus* y *T. saginata* (Lightowlers *et al.*, 2000).

Estos antígenos han sido aislados por ser altamente efectivos en la prevención de teniasis en ovejas y vacunos. Los primeros antígenos estudiados, fueron los de *Taenia ovis* (To45W, To16 y To18) los cuales han sido clonados y expresados en *E. coli* demostrando ser protectivos ante un desafío experimental (Harrison *et al.*, 1996). Los antígenos protectivos homólogos a *T. solium*, de estos parásitos han sido identificados, recombinados y expresados en *Escherichia coli* para producir Tsol18 y Tsol45 (González *et al.*, 2005).

Martínez-Ocaña *et al.*, (2006) buscó evaluar la expresión fenotípica de Tsol18 y Tsol45 en el parásito adulto y cisticerco de *Taenia solium* por inmunohistoquímica, usando los anticuerpos producidos en el ensayo de vacunación contra la cisticercosis porcina. Los resultados mostraron que los anticuerpos anti-Tsol18 solo reconocen los péptidos expresados en la oncósfera de *T. solium* (forma infectante para producir la cisticercosis). Por otro lado, los anticuerpos anti-Tsol45 reconocen testículos y ovarios de proglotis en proceso de maduración en el parásito adulto de *T. solium*.

Esto demuestra que el Tsol18 es un antígeno estadio-específico, por esta razón constituye el blanco ideal para la vacuna contra la cisticercosis porcina. Ambos antígenos vacunales son potencialmente importantes, el primero (Tsol18) para la vacuna contra la cisticercosis y el segundo (Tsol45), para una vacuna experimental contra la teniasis (Martínez-Ocaña *et al.*, 2006).

Arriola (2004) demostró que el antígeno secretorio/excretorio de oncósferas activadas de *Taenia solium* poseen capacidad protectora en cerdos contra la cisticercosis porcina ante una infección experimental. Determinando así, que las proteínas del antígeno S/E son apropiadas para el desarrollo de una vacuna contra la cisticercosis porcina.

Desde la demostración que los antígenos derivados de la oncósfera son una fuente rica en antígenos protectores, muchos estudios se han llevado a cabo para determinar el nivel de protección en varias especies de tenias, obteniendo resultados satisfactorios. Posteriormente, con el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, se ha podido desarrollar vacunas recombinantes, las cuales presentan numerosas ventajas con los consiguientes mejores resultados (Cuadro 1).

Cuadro 1. Antígenos recombinantes de oncósfera de tenia que han demostrado inducir una respuesta inmune protectora. Fuente: Lightowlers *et al.*, 2003.

Especies	Antígeno	Grupo homólogo	Protección ^b (%)
<i>Taenia ovis</i>	To45W	45W	94
	To45S	45W	87
	To16K	16K	92
	To18K	18K	99
<i>Taenia saginata</i>	TSA-9	45W ^c	99
	TSA-18	18K ^c	99
<i>Tenia solium</i>	TSOL18	18K	100
<i>Echinococcus granulosus</i>	EG95	EG95	96
			100
<i>Echinococcus multilocularis</i>	EM95	EG95	83

^a Asignación a un grupo homólogo particular, designado por la abreviación usada para el primer antígeno del grupo a ser caracterizado, indica un alto nivel de homología de los aminoácidos entre antígenos

^b Indica el nivel óptimo de protección obtenido tras vacunación e infección del hospedero intermediario natural comparado con los controles infectados.

^c TSA-9 y TSA-18 actúan sinérgicamente; los resultados muestran pruebas de vacunación utilizando ambos antígenos juntos

Tsol18, es una proteína producida durante el estadio de oncósfera de la *T. solium*. Esta proteína usada en dos dosis de 200ug de una vacuna recombinante GST-Tsol18 mostró una protección del 100% (Flisser *et al.*, 2004). Los estudios realizados en nuestro país con Tsol18 mostraron niveles de protección altos en animales inmunizados (González *et al.*, 2005). Sin embargo, el requerir al menos dos dosis para ser efectiva, afecta directamente el costo del tratamiento (García *et al.*, 2007; Gilman *et al.*, 1999).

Cepa atenuada de Salmonella entérica var. Typhimurium

Las bacterias poseen naturalmente moléculas inmunoestimuladoras como lipopolisacáridos y flagelos que pueden estimular a respuesta inmune (Kotton y Hohmann, 2004). Gracias a esto, el uso de vectores bacterianos permite imitar una infección natural e interactuar con los diferentes compartimentos del sistema inmune. En la actualidad, se ha logrado expresar en estos vectores, antígenos heterólogos de bacterias, hongos, virus y parásitos (Kotton y Hohmann, 2004).

Internacionalmente, existen tres vacunas de bacterias vivas comercialmente disponibles y en uso clínico: Salmonella entérica serovar Typha Ty21a, Vibrio cholerae CVD 103-HgR y Mycobacterium Boris BCG (Kotton y Hohmann, 2004). Mediante el uso de BCG, *L. monocytogenes*, Salmonella y Shiguella como vectores recombinantes se puede inducir una respuesta inmune humoral y celular contra el antígeno portado (Shata *et al.*, 2000; Kotton y Hohmann, 2004).

El uso de vacunas multivalentes para humanos y animales, con base en la expresión de antígenos heterólogos en salmonelas vivas atenuadas, ha recibido una considerable atención (Chabalgoity *et al.*, 1997). Mediante manipulación genética se ha logrado conseguir la pérdida de la patogenicidad de la Salmonella sin interferir en su reproducción y habilidad de estimular la respuesta inmune, generando una fuerte inmunidad de mucosa junto con respuesta humoral y celular (Dougan *et al.*, 1989).

Se han desarrollado cepas recombinantes usadas como vacunas que poseen un vector plásmido, el cual lleva la secuencia del antígeno foráneo (Chatfield *et al.*, 1994). Se ha buscado mantener este plásmido en la bacteria para inducir una adecuada

respuesta contra el antígeno recombinante. La metodología de inserción es por clonación en plásmido portador que se transforma en la Salmonella atenuada.

Para conseguir esto se trabaja mediante el sistema *asd*, en el cual se elimina el gen que codifica al Ácido diamino pimérico (*asd*) (Kotton y Hohmann, 2004). Este ácido es componente de la pared celular de las bacterias Gram negativas y se encuentra ausente en los mamíferos. De esta manera el *asd* es introducido en el plásmido para complementar la mutación en la bacteria y permitir solamente el crecimiento de las bacterias en las que el plásmido se haya ubicado correctamente (Kotton y Hohmann, 2004).

Operones de expresión de Salmonella (Control de la expresión genética.)

El control de la expresión de los genes, activándolos y desactivándolos cuando sea necesario, ayuda a evitar que las células desperdicien sus recursos y energía cuando no sea necesario. Los genes son usualmente regulados durante la transcripción, cuando el ARNm es sintetizado a ADN.

Los operones son un grupo de genes que funcionan para producir proteínas necesarias para el funcionamiento de la célula. Se reconocen dos tipos de genes dentro de los operones: los estructurales y los reguladores (operador y promotor). Las secuencias específicas llamadas secuencias reguladoras se ubican usualmente cerca de los genes estructurales. Estas secuencias reguladoras sirven como sitio de unión de las proteínas reguladoras llamadas factores de transcripción. Las proteínas que bloquean la transcripción son llamadas represores, mientras que las que permiten la transcripción son llamadas activadores.

Entre los operones mas estudiados encontramos al operón Lactosa (Lac), Triptofano (Trp) y el Arabinosa (Ara). Para el control de la expresión de la Salmonella, en este estudio, se utilizó al operón arabinosa.

Operón Arabinosa (Ara)

La arabinosa es un azúcar que sirve como fuente de energía y carbono a la bacteria. La misma bacteria codifica tres genes que necesitan ser expresados para el transporte y conversión de la arabinosa a una forma que pueda ser utilizada por el organismo. Estos genes (*araA*, *araB* y *araD*) solo son expresados cuando la arabinosa está presente en el medio y juntas conforman el operón arabinosa (Santa Clara County Biotechnology Education Partnership/Eastbay biotechnology Education Program, 2011).

Un cuarto gen codifica a una proteína (*araC*) y esta es la que actúa como el regulador de los genes estructurales ya que es necesaria para su transcripción. El operón arabinosa usa tanto el control positivo como el negativo. Al *araC* se une con su propio gen estructural previniendo su transcripción y regulando así su propio nivel. Cuando los niveles de *araC* son bajos, la transcripción ocurre y se sintetiza más *araC*.

AraC también se une a otros sitios dentro del operón (Fig. 6), inhibiendo la transcripción de los tres genes estructurales, los cuales usualmente no están activos ya que el *araC* está bloqueando la unión del ARN polimerasa responsable de la transcripción del gen que degrada a la arabinosa.

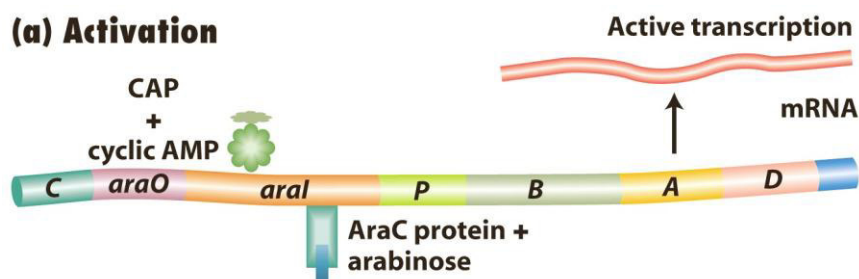


Figura 6. Esquema de la activación del operón arabinosa (Tomado de: Griffiths *et al.*, 2008).

Cuando la arabinosa está presente en el medio, esta se une a *araC* causando un cambio en su estructura (Fig. 7), lo cual permite que se una el promotor a la ARN polimerasa y de esta manera ocurre la transcripción del operón.

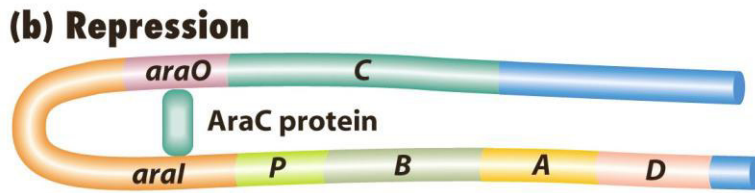


Figura 7. Esquema de la represión del operón arabinosa (Tomado de: Griffiths *et al.*, 2008).

FAST-ELISA para detección específica de anticuerpos vacunales

Se desarrolló la estandarización de un FAST-ELISA para la detección específica de anticuerpos vacunales producidos por la vacuna recombinante de Tsol18. Para lo cual se purificó el antígeno Tsol18 para detectar la respuesta específica.

Para la detección de los anticuerpos específicos contra este, la vacuna recombinante expresará en un vector pET, la producción de la proteína recombinante con una secuencia líder (6Xhis). Esta secuencia líder será removida enzimáticamente y el Tsol18 desnudo será repurificado. Este Tsol18 desnudo será usado como antígeno en el ELISA para la medición de la respuesta inmune específica inducida por la vacuna.

Para la estandarización de la prueba se preparó la curva estándar utilizando IgG de cerdo sano. Se realizó la prueba del conjugado para evitar la presencia de reacciones inespecíficas, la titulación del antígeno hasta hallar su nivel de saturación y la titulación del anticuerpo para determinar la dilución del suero a ser utilizada.

Los beneficios de esta prueba son su rapidez, la factibilidad de ser realizada en campo y sobre todo su capacidad de cuantificar la respuesta. Los resultados arrojados por esta prueba permiten establecer una correlación entre los niveles de anticuerpos y la protección en cerdos vacunados (Silva M, Lima, Comunicación personal).

Respuesta inmune inducida en ratones

La vacuna sectorizada ha sido probada mediante la respuesta inmune específica de tipo humoral (IgG) en ratones. En cerdos se demostró la capacidad protectora del antígeno vacunal Tsol18. Esta ha sido probada en cerdos cuando fue utilizada como proteína recombinante de inyección directa (Flisser *et al.*, 2004, González *et al.*, 2005)

Se realizó un experimento en el cual se buscó determinar si es que la vacuna recombinante era capaz de inducir la producción de cantidades significantes de anticuerpos específicos. Para lo cual se trabajó con tres grupos de ratones. A dos de ellos se les inmunizó vía oral utilizando dos diferentes clones de la misma vacuna y en el tercer grupo se utilizó sólo el plásmido vector. Se realizó la prueba usando una y dos dosis. Semanalmente se recolectó muestras de sangre de todos los ratones durante dos meses. Terminado este periodo se procedió a detectar la presencia de anticuerpos específicos mediante la prueba del FAST-ELISA.

Los resultados demostraron que los ratones inmunizados presentaban niveles de IgG específicas al Tsol18 considerables, mientras que los animales vacunados sólo con el plásmido vector, no produjeron reacción alguna. Demostrando así la capacidad de la vacuna de producir una considerable respuesta específica en el ratón (Silva M, Lima, Comunicación personal).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

LUGAR DE ESTUDIO

El estudio se realizó en las instalaciones experimentales del “Cisticercosis Working Group” ubicadas en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, bajo medidas extremas de bioseguridad.

NÚMERO DE MUESTRA Y ANIMALES DE ESTUDIO

Se usaron animales libres de cisticercosis (Western blot negativos) provenientes de una granja de crianza tecnificada ubicada en Huaral.

El tamaño muestral fue determinado mediante diferencia de medias, en base al número de quistes presentes en la carcasa. Teniendo un esperado en el grupo control de 1000 quistes y no más de 10 en el grupo vacunado, con un nivel de confianza del 95% y un poder de la prueba del 80%, necesitaríamos de 7 animales por grupo para comprobar la hipótesis.

Este estudio utilizó 16 animales de 2 meses de edad, divididos en 2 grupos al azar. Los grupos se presentan en la Cuadro 2.

Cuadro 2. Grupos experimentales utilizados en el estudio y sus características

Grupo	Vacuna	Infección
Control Negativo	NO (solo plásmido)	SI
Experimental	SI (Tsol18-GST)	SI

Control negativo: Fueron inoculados con Salmonella conteniendo el plásmido solo

Experimental: Fueron inoculados con Salmonella con el plásmido codificado con el Tsol18-GST

PREPARACIÓN DEL CULTIVO VACUNAL

Se realizó la preparación del agar Lennox. Suplementado con glucosa 0.1%, Manosa 0.2% y Arabinosa 0.2%. Una vez obtenido el medio enriquecido se colocó en placas, las cuales pasaron la noche en una estufa a 37°C.

Al día siguiente se realizó el sembrado de las bacterias con pipetas estériles descartables. Las cepas usadas fueron cepas disponibles para investigación proporcionadas por el Dr. Roy Curtis III (Co-director of the Center for Infectious Diseases and Vaccinology, Biodesing Institute, Arizona State University). Estas cepas fueron las siguientes:

Cepa control: pYA3620

Cepa vacunal: pYA3620-A129-505

El genoma de la Salmonella usada es el siguiente:

9402 Δ pmi-2426 Δ (gmd-fcl)-26 Δ P_{fur81}::TT araCP_{BADfur} Δ P_{crp527}::TT araC P_{BADcrp}
 Δ asdA21::TT araC P_{BADc2} Δ araE25 Δ araBAD23 Δ relA198::araC P_{BADlacITT}
 Δ sopB1925

Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Pasado este tiempo se pudo observar el crecimiento de colonias bacterianas en las placas. Se utilizaron tres colonias de cada placa para realizar el PCR y el cultivo celular.

Se tomó media colonia bacteriana y se colocó en 10ul de agua libre de DNAsa. Paralelamente se preparó el mezcla para PCR dentro de una cabina de flujo laminar (Sambrook *et al.*, 1989). Para formar esta mezcla se utilizaron las siguientes cantidades por muestra:

18.375ul	Agua (dH ₂ O)
2.5ul	10xPCR Buffer
2ul	dNTPs mix
0.5ul	Primer F (pyAF 50pm/ul)
0.5	Primer R (pyAR 50pm/ml)
0.125ul	Ampli taq

Por lo tanto, en cada vial de PCR se colocó 24ul de la mezcla y 1ul del ADN. Estas muestras fueron colocadas en el termociclador (GenAmp PCR System 9700 Applied Biosystems) utilizando los siguientes tiempos y temperaturas (Fig. 8).

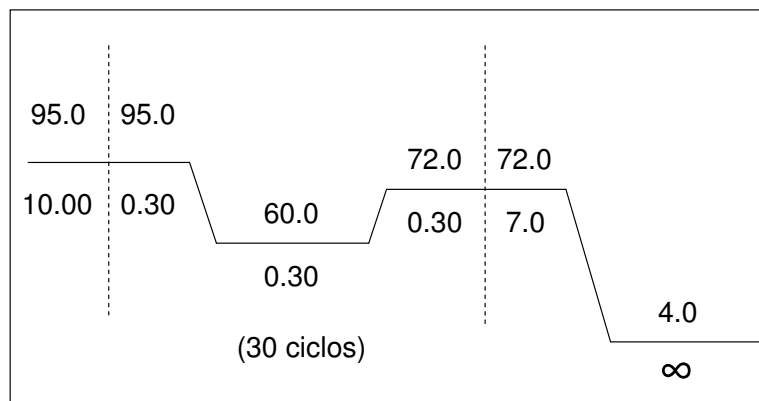


Figura 8. Ciclos utilizados en el PCR aplicado al cultivo vacunal

La observación de los productos de PCR se realizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Cada muestra fue colocada en los posillos formados en el gel. Se colocó un posillo con el marcador de peso molecular, uno con el control negativo y otro con el gen control. Una vez listos los posillos, se inició la corrida electroforética.

Así mismo, las medias colonias restantes fueron incubadas en tubos estériles con 6ml de cultivo celular Lennox, al cual se le añadió 0.2% de manosa, 0.2% de arabinosa y 0.1% de Glucosa. Los tubos fueron guardados en estufa a 36.7°C sobre un homogenizador durante 24 horas.

El cultivo resultante fue centrifugado y lavado 2 veces con medio de cultivo sin arabinosa. Finalmente, se preparo en tubos falcon de 50ml, donde se colocó 40ml del preparado (control y vacunal).

MANEJO DE ANIMALES

Llegada de animales

Los animales fueron recibidos en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM. Debido al viaje desde Huaral se les ubicó en los respectivos ambientes y se les dio un reposo de 24 horas antes de trabajar con ellos.

Los animales fueron vacunados contra cólera porcino (Pest-vac®), aretados y se les tomó una muestra de sangre para conocer su estado basal.

Vacunación

El día de la vacunación los animales fueron mantenidos en ayunas. Previamente a la dosificación de la vacuna, se les administró 6ml de bicarbonato de sodio vía oral. Para esto se utilizó una jeringa verificando que los animales ingirieran toda la dosis (Fig. 9).

Los animales del grupo experimental fueron elegidos al azar y vacunados con una dosis única de 10^{12} CFU de la vacuna vía oral conteniendo el plásmido con Tso118. Se le administró esta dosis vía oral por medio de 5ml del preparado anteriormente descrito.

Al igual que en la administración del bicarbonato se verificó que ingirieran la dosis completa.

El grupo control negativo se inmunizó de la misma manera utilizando la Salmonella conteniendo el plásmido solo. Todos los animales fueron observados durante dos horas luego de la vacunación.



Figura 9. Dosificación oral de la vacuna recombinante de cisticercosis porcina a cerdos.

Infección

Se realizó el entrenamiento de los cerdos utilizando bolas de plátano con afrecho. Estas fueron ofrecidas a los cerdos en unas bateas pequeñas. Para esto eran separados dentro de su mismo corral en unas jaulas de metal. Poco a poco los animales ganaron la confianza de acercarse a la batea y perdieron el miedo a la jaula. Este entrenamiento se realizó por varios días y fue de gran ayuda para el día la infección.

15 días después de la inmunización se realizó la infección de los animales de ambos grupos, dándoles de comer proglotis de *Taenia solium* (Silva, 2004). Para esto se utilizaron las bolas previamente descritas. Se verificó que el animal haya comido toda la bola incluyendo el proglótido. Luego se utilizó Frutiflex® para limpiar los restos de la batea y se le dio de beber a los cerdos. Los animales fueron observados durante 2 horas post infección.

Recolección de suero

Se tomó semanalmente una muestra de sangre de cada animal utilizando la técnica descrita por Leman *et al.*, (1986). La sangre fue extraída mediante venopunción de la vena cava anterior izquierda utilizando el sistema vacutainer. Los sueros fueron separados por centrifugación y alicuotados para ser guardados en congelación hasta su análisis. Todas las muestras fueron analizadas utilizando FAST-ELISA desarrollado especialmente para la detección y cuantificación de anticuerpos específicos.

Para la extracción de sangre los animales fueron colocados en posición cúbito dorsal, sujetando sus piernas y brazos, mientras una segunda persona sujeta la cabeza. De tal manera que el animal quede con el cuerpo totalmente recto (línea recta entre la cabeza y el cuerpo).

Tanto para animales pequeños como grandes, el sangrador se colocó al lado izquierdo del animal para localizar, mediante el tacto, la zona de sangrado en el espacio entre el manubrio del esternón y el borde craneal de la primera costilla, preferentemente del lado derecho del animal, para evitar contacto con el nervio vago. Una vez ubicado el punto se procede a tomar la muestra de sangre utilizando el sistema vacutainer de tubos al vacío. Para lo cual se introdujo la aguja perpendicular al animal hasta ubicar la vena cava anterior.

Todos los tubos son identificados con el arete del animal, sexo y fecha de muestreo. Los tubos fueron guardados en refrigeración durante aproximadamente dos horas, para luego proceder a centrifugarlos a 2600 rpm durante 8 minutos, para la extracción del suero. El suero obtenido fue guardado en refrigeración y en viales para su posterior procesamiento.

Necropsia y conteo de quistes

Tres meses después de la infección se realizó la necropsia de los animales y el conteo de la totalidad de los quistes presentes en la carcasa. Se determinó también la

viabilidad *in vitro* de estos, incubando en bilis bovina por una hora a 37°C como lo describe González (1995).

Las necropsias se llevaron a cabo en los pabellones de infecciones experimentales de la FMV-UNMSM. Se realizó la necropsia de 3 animales diarios. La asignación de la fecha de necropsia de cada cerdo se realizó en ciego.

Para la eutanasia de los animales se utilizó una combinación de Ketamina (Ket-A-100®, 20 mg/kg IM) y clorhidrato de Xylacina (Dormi-Xyl®2, 2 mg/Kg IM) para conseguir la anestesia general del animal (Swindle, 1998). En este momento se tomaron las últimas muestras de sangre de cada animal, siguiendo el mismo procedimiento antes mencionado. Una vez pesado y acomodado en la mesa de necropsia se le aplicó una sobredosis de pentobarbital sódico (Halatal®, 70 mg/Kg IV) produciendo en el cerdo un paro cardio-respiratorio.

Posterior a la muerte del animal se realizó un corte limpio a la altura del cuello para separar la cabeza del cuerpo (altura del atlas y del inicio de la traquea). La cabeza fue llevada a una mesa especial para el retiro de los músculos faciales, el cerebro y la lengua. Estos colocaron en una bandeja, rotulada con el número de arete del cerdo al cual pertenece.

Paralelamente se desolló el cuerpo del animal y se entró a cavidad abdominal primero, y luego torácica para retirar los órganos del aparato respiratorio, digestivo y urinario, los cuales se colocaron en una bandeja donde fueron inspeccionados en busca de otros parásitos. El corazón se colocó en la misma bandeja rotulada usada para los músculos faciales, cerebro y lengua.

La totalidad de la carcasa fue dividida en las partes mencionadas posteriormente y cada una fue colocada en una bandeja rotulada con el código del animal y la parte de la carcasa a la que pertenece. Las partes son las siguientes: Pierna derecha, Pierna Izquierda, Brazo derecho, Brazo Izquierdo, Costillar Derecho, Costillar Izquierdo, Cuello/columna y Sacro.

Toda la carne fue examinada en su totalidad mediante finos cortes en busca de quistes (sanos, degenerados y cicatrices). Todo lo encontrado se anotó en la ficha de necropsia del animal (Apéndice 1, 2). Los órganos previamente separados (corazón, lengua y músculos de cabeza), también se sometieron a conteo, siendo pesados previamente.

Durante el conteo se recolectaron 30 quistes aparentemente sanos por animal para ser sometidos a la prueba de evaginación en bilis bovina. Los quistes se colocaron en una placa petri con bilis bovina y fueron guardados en una estufa a 37°C durante 2 horas. Transcurrido el tiempo se retira la placa de la estufa, y se cuentan los quistes evaginados y que presenten movimiento. El resultado es expresado en porcentaje en relación a la cantidad de quistes puestos a evaginar.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS: FAST-ELISA

El FAST-ELISA es un sistema que consiste en palillos fijados en una tapa que encajan perfectamente en una placa de ELISA de 96 pocillos (Silva, 2010). El antígeno es absorbido en los palillos, lavados y luego expuestos a los anticuerpos séricos, seguidamente se expone al conjugado y finalmente al sustrato, en incubaciones de 5 minutos cada una. La reacción es detenida al remover los palillos del sustrato. Todos los pasos seguidos por el FAST-ELISA fueron desarrollados como se describió previamente (Hancock y Tsang, 1986; Handali *et al.*, 2004).

En resumen, los palillos fueron sensibilizados con el antígeno diluido en 0.05M Tris/HCl, 0.3 KCl, 2.0mM Acido Etileno Diamino Tetracético (EDTA); pH 8.0 (buffer de pegado) en los 96 pocillos (Nunc, catalog #2696200) durante dos horas en un shaker orbital (Titer Plate Shaker; Laboratory-Line Instruments, Melrose Park, IL) a temperatura ambiente (TA).

Luego de la sensibilización, los palillos fueron lavados con 0.15M NaCl en 0.01M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄; pH 7.2 (PBS), conteniendo 0.3% tween 20 (Sigma Chemical Company) usando un spray de jardinería. Los lavados se realizaron luego de

cada incubación. Después de cada lavado, los palillos fueron enjuagados con agua desionizada.

El suero porcino fue diluido a 1:200 en PBS; 0.3% tween 20; 5% leche libre de grasa y analizadas por triplicado. Las muestras con una actividad mayor al máximo punto de la curva estándar fueron diluidas y probadas varias veces hasta que su actividad se encuentre dentro de la curva estándar. El conjugado fue utilizado en una dilución de 1:3000 (Tsang *et al.*, 1995). 3, 3', 5, 5' Tetrametilbencidina; TMB-Sure blue (Kirkegaard and Perry Laboratorios) fue usado como sustrato. La solución sustrato fue colocada en la placa y los palillos fueron incubados nuevamente como en los pasos previos durante 5 minutos. La reacción fue detenida mediante la remoción de los palillos del sustrato. La absorbancia fue medida a 630nm en una lectora de microtitulación ThermoMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La concentración de cada muestra fue derivada de la curva estándar y expresada en microgramos/ml.

Preparación del Antígeno.

El antígeno Tsol18 de la *Taenia solium* fue clonado en un vector pET100 propagado en células TOP10 y expresadas en *E. coli* (BL21 Star) (Invitrogen, San Diego, CA) con una secuencia líder marcada 6Xhis. La proteína recombinante expresada, que contiene la secuencia líder marcada 6Xhis (16.9kDa), fue purificada por afinidad de la fracción soluble de urea de la célula lisada utilizando una columna de Níquel (His-Trap GE).

Para evitar reacciones no específicas, la secuencia líder fue removida por cortes enzimáticos con enteroquinasas (1U/20 ug/30ul) (Catalog No: E180-01; Invitrogen, San Diego, CA). La enzima fue removida utilizando una columna inhibidora de tripsina de soya (Catalog No: 20235; Pierce, Rockford IL).

El pico no fijado fue re-purificado mediante cromatografía de afinidad del níquel para deshacerse de la secuencia líder 6Xhis. El Tsol18 desnudo (13.4 kDa) fue luego usada como antígeno para el desarrollo del FAST-ELISA.

Preparación de la curva estándar

La curva estándar de Inmunoglobulina G (IgG) fue preparada tal como lo describe Scheel (2006). La inmunoglobulina normal de porcino (PrIgG) fue precipitada usando sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; purificada mediante cromatografía de intercambio de iones utilizando una columna Gamma G Hi-Trap (Amersham Biosciences) y cuantificada mediante la prueba de proteína de Bradford. Las PrIgGs purificadas fueron guardadas en nitrógeno líquido hasta su uso. Con la finalidad de preparar la curva estándar, las PrIgGs fueron diluidas en PBS; pH 7.2, 0.1% azida sódica, 0.001% fracción V de albúmina de suero bovino (BSA), libre de proteasa (Catalog No: 3116999001, ROCHE) para trabajar a una dilución de 100u/ml. Una curva piloto de 11 puntos fue construida en las siguientes concentraciones (ug/ml): 12.5, 6.25, 3.18, 1.6, 0.8., 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 y 0.b.

Las diluciones estándar fueron almacenadas a -4°C . Los estándares fueron asignados con valores de reactividad que corresponden a su concentración. La curva estándar fue probada por triplicado.

Optimización de los reactivos

En el formato del FAST-ELISA todos los reactivos deben ser añadidos en exceso con excepción del que va a ser medido. Se utilizó la titulación para determinar la cantidad de antígeno que será considerado en exceso. Se disminuyó la dilución a la mitad de Tsol18 en buffer de sensibilización (De 10ug/ml a 0mg/ml) fueron pegados por triplicado.

Titulación del antígeno

Para la titulación del antígeno (Fig. 10), los reactivos restantes usados para el ELISA fueron colocados en exceso. El suero de cabra hiperinmune diluido a 1:4 fue usado como fuente de anticuerpos. La titulación del conjugado se desarrolló mediante el análisis de varias diluciones del mismo. En este caso, tanto el antígeno como el

anticuerpo fueron usados en exceso. Se determinó que el conjugado en dilución 1:3000 en PBS- 0.3% tween 20 se considera en exceso.

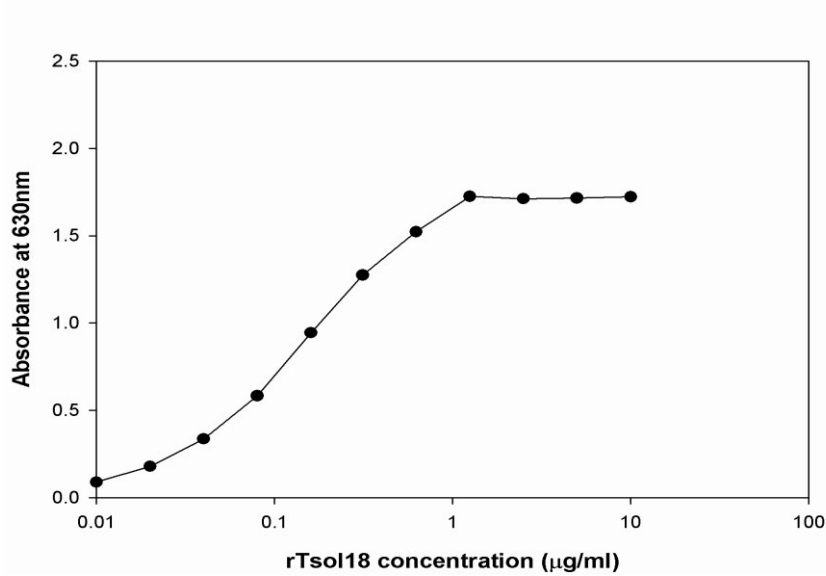


Figura 10. Titulación del Antígeno Tsol18 para estandarización del FAST-ELISA para la detección de anticuerpos específicos de Tsol18

Titulación del anticuerpo

La titulación del anticuerpo fue desarrollada usando un pool de suero proveniente de cerdos vacunados, para determinar el rango dinámico del ensayo (Fig. 11). Para la titulación, las placas fueron sensibilizadas con 2µg/ml del antígeno Tsol18 purificado (antígeno en exceso). Una dilución seriada del pool de sueros positivos en PBS-0.3% tween 20/5% leche no grasa fueron analizadas en FAST-ELISA por triplicado. Dilución seriada de suero porcino normal fue probada en la misma placa, para ser usada como control. Se calculó las señales del radio de interferencia para cada dilución de suero.

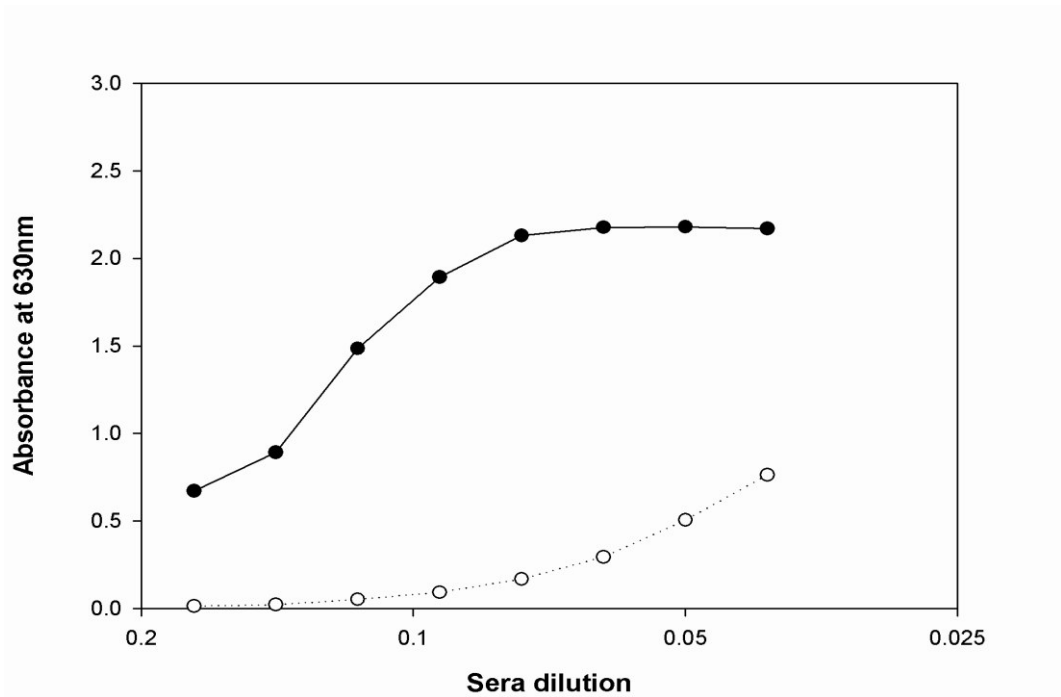


Figura 11. Titulación del anticuerpo para estandarización del FAST-ELISA para la detección de anticuerpos específicos de Tsol18.

Variabilidad de la prueba

Variación intra e inter prueba fue determinado como ha sido descrito previamente (Hancock y Tsang, 1986). Brevemente, para determinar la variación intra prueba fue usado el coeficiente de variación (CV) de cinco muestras de suero corridas en placas separadas. La variación inter prueba fue calculada usando una muestra positiva de referencia que fue corrida 20 veces en un periodo de 3 semanas.

Sueros problema

Los sueros analizados provienen de 16 cerdos vacunados a los dos meses de edad. La mitad de ellos vacunados con la salmonella recombinante conteniendo el plásmido con el antígeno Tsol18 y la mitad restante conteniendo el plásmido solo. Estos animales fueron infectados con *T. solium* mediante ingestión oral de proglotis de la tenia.

Las muestras de suero fueron obtenidas cada 15 días durante tres meses y sometidas a la prueba de ELISA al terminar este periodo.

Análisis de resultados

Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando estadística descriptiva con ayuda del programa STATA 9.0 ®.

La protección de la vacuna fue definida como la reducción del porcentaje en el promedio de cisticercos vivos producto de la vacuna, comparada con el promedio de cisticercos vivos en el grupo control, tal como lo hiciera Flisser *et al.*, (2006).

IV. RESULTADOS

Se presentan los resultados del monitoreo y sangrado quincenal de cerdos infectados oralmente con proglotis de *T. solium* y que previamente recibieron la vacuna recombinante de cisticercosis porcina; así como los resultados obtenidos a la necropsia realizada tres meses post infección.

A la necropsia, se hallaron en la carcasa cisticercos vivos y cisticercos degenerados tanto en la musculatura de la carcasa como en el corazón, lengua y cerebro (Cuadro 3, Apéndice 3). Con excepción del animal 9270, todos los animales de ambos grupos presentaron cisticercos en la carcasa ya sean vivos o muertos. Todos los cisticercos del grupo no vacunado presentaron evaginación en diferentes porcentajes siendo el promedio de 78.7%, mientras que en el grupo vacunado los cisticercos de algunos animales no presentaron evaginación obteniéndose un promedio de 30.1%.

Ni un animal del grupo vacunal presentó más de 200 quistes vivos, sin embargo en el grupo no vacunal encontramos animales que sobrepasan los 3000 cisticercos vivos. En promedio se observó que los animales vacunados presentan 52.8 cisticercos vivos y los no vacunados 1344.3, en toda la carcasa. De aquí se desprende que la vacuna produjo una protección del 96.1% $[(1344.25-52.75)/1344.25] * 100$.

Cuadro 3. Cisticercos y su porcentaje de evaginación encontrados a la necropsia de cerdos vacunados y no vacunados con la vacuna recombinante de cisticercosis porcina.

Vacunados					No vacunados				
Animal	Vivo (n)	Evaginado (%)	Muerto (n)	Total (n)	Animal	Vivo (n)	Evaginado (%)	Muerto (n)	Total (n)
9272	16	0	27	43	9269	731	96.2	47	778
9268	92	60.0	12	104	9273	353	94.7	106	459
9270	0	0	120	120	9495	1	-	39	40
9486	181	86.7	76	257	9496	3616	100.0	23	3639
9489	27	7.1	46	73	9497	17	16.6	69	86
9490	74	86.6	3	77	9498	3362	100.0	37	3399
9491	4	0	336	340	9499	2367	50.0	153	2520
9494	28	0	13	41	9500	307	93.3	356	663
X	52.8	30.1	79.1	131.9	X	1344.3	78.7	103.8	1448

Se realizó el análisis de los quistes aplicando el test de Mann-Whitney hallándose diferencias en la presencia de cisticercos vivos ($z=0.0357$) y totales ($z=0.0357$) entre los animales vacunados y no vacunados. Sin embargo no se encontró diferencia alguna en la presencia de quistes degenerados ($z=0.2936$).

Los niveles del promedio final de anticuerpos fueron mayores ($F<0.0000$) en los animales del grupo vacunado que en los no vacunados, en este último grupo no se observa un alza de anticuerpos en ningún tiempo (Fig. 12). Los niveles de anticuerpos fueron superiores en todos los tiempos medidos en los animales vacunados.

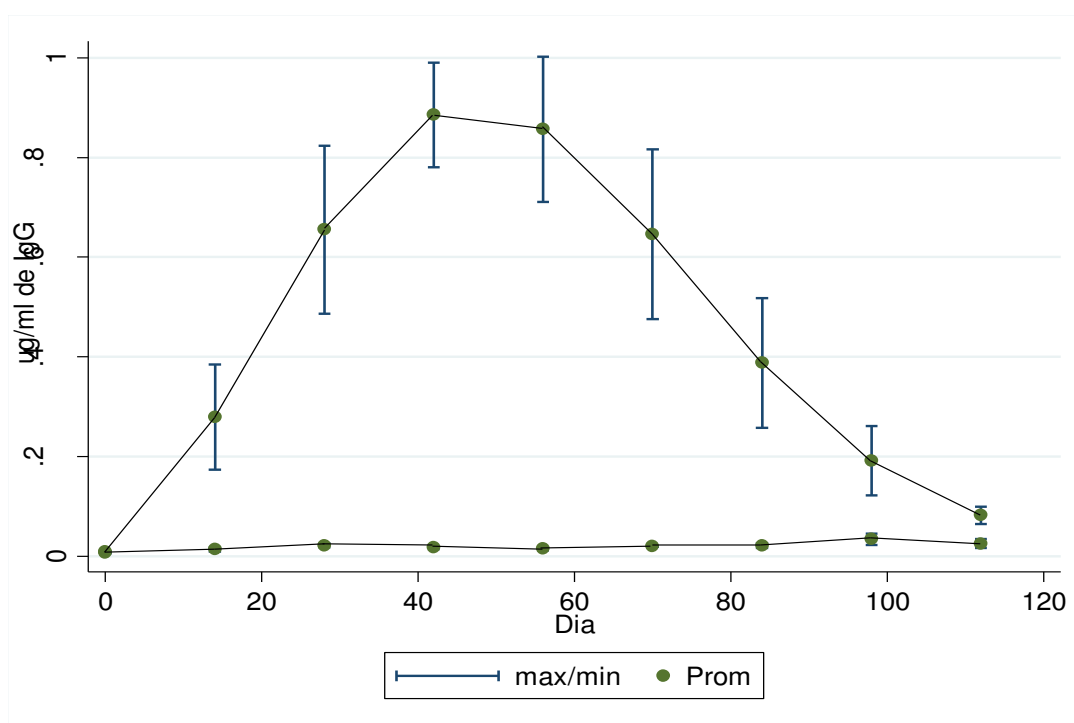
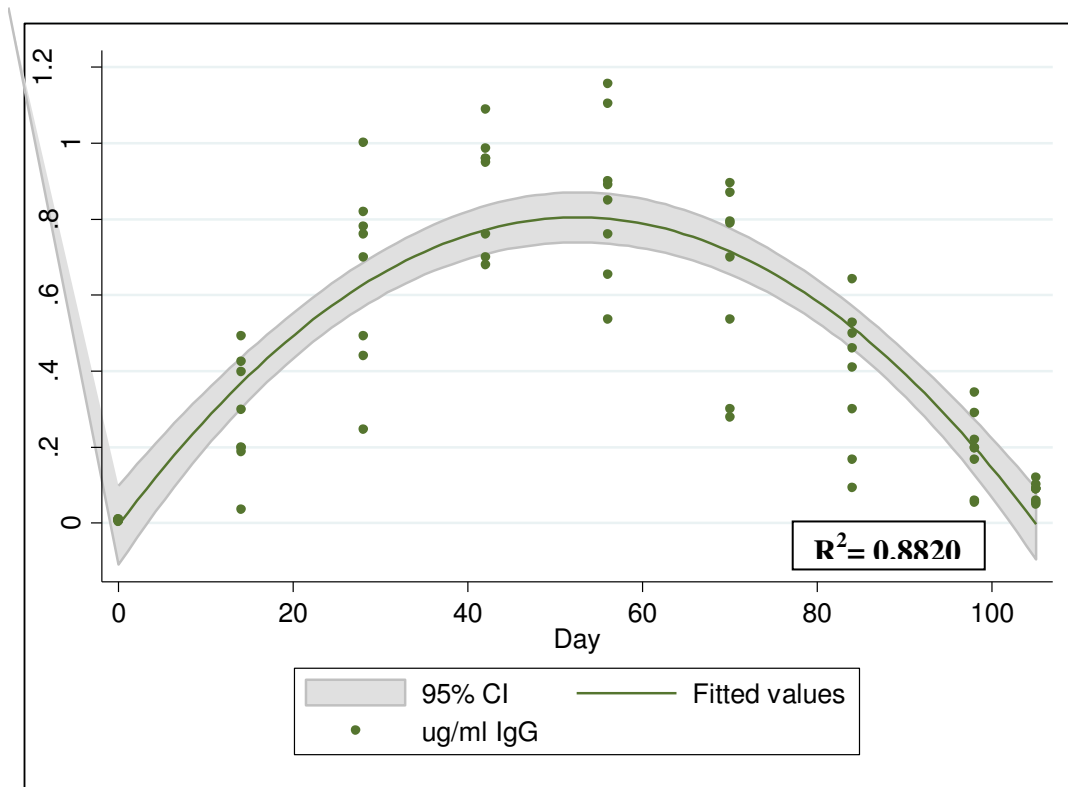


Figura 12. Variación de anticuerpos ($\mu\text{g/ml}$ de IgG) detectados mediante FAST-ELISA en animales vacunados y no vacunados.

Los anticuerpos de los animales vacunados mostraron un comportamiento cuadrático, elevándose los primeros días para luego descender a través del tiempo. La regresión se muestra en la Figura 13.

Aplicando esta fórmula se obtuvo en el día 55, la máxima cantidad de anticuerpos, siendo este de $0.774\mu\text{l/mg}$ IgG.



$$Y = -0.40 + 0.48x - 0.05x^2$$

Figura 13. Regresión obtenida a partir de los niveles de IgG encontradas en los animales vacunados con la vacuna recombinante de cisticercosis porcina.

V. DISCUSIÓN

PROTECCION DE LA VACUNA

El complejo *T. solium*-cisticercosis es una enfermedad potencialmente erradicable (CDC, 1993). Por esta razón se han implementado en el campo medidas de control y erradicación como: la identificación y tratamiento de portadores de tenias; tratamiento de cerdos; educación y sanidad. A pesar de estos esfuerzos, la transmisión de la enfermedad solo puede ser interrumpida temporalmente y la recrudescencia ocurre como consecuencia de la reintroducción de la tenia y la infección de cerdos sanos (González *et al.*, 2003). La vacunación en cerdos es una medida que ha sido probada como un complemento a los programas de control, ya que es una de las herramientas más eficaces para el manejo de las enfermedades infecciosas en la salud pública y producción animal.

En el estudio realizado por Flisser *et al.* (2004), el uso de la vacuna Tsol18 logró una protección del 100%. Una diferencia entre el protocolo de inmunización fue la aplicación, por Flisser, de una segunda dosis, dos semanas luego de la administración de la primera dosis. Es probable que esta segunda dosis, al producir un nuevo pico de anticuerpos, logre una mayor protección evitando el desarrollo de quistes, lo cual no sucedió con la vacuna recombinante usada en el presente estudio. Sin embargo, lo que se buscó en este estudio, es una vacuna capaz de lograr protección con una sola dosis y de esta manera disminuir el manejo y el stress de los animales.

Otra diferencia con el estudio realizado por Flisser *et al.* (2004) es el uso del adyuvante Quil A. Este adyuvante ayuda a mejorar la inmunogenicidad de la vacuna permitiendo mejores resultados en el alza de anticuerpos; sin embargo, la vacuna del presente estudio no necesitó del adyuvante para lograr la estimulación del sistema inmune, siendo esto una de sus ventajas.

Un sistema de vacunación eficaz debe contar con ciertas características que finalmente permitan la protección ante la infección. Este sistema debe ser de fácil y sencilla administración, asequible y capaz de promover una protección de larga duración (Nayak *et al.*, 1998). Así mismo, las vacunas capaces de estimular no sólo la respuesta inmune sistémica, sino también de la de mucosa, tienen la ventaja de estimular la respuesta inmune local en el puerto de entrada. En este sentido, el uso de bacterias atenuadas, que no son capaces de causar enfermedad clínica pero si provocan una infección autolimitada que conduce a la estimulación de la inmunidad protectora, representa una alternativa atractiva (Spreng *et al.*, 2006).

Por otro lado, la obtención de una vacuna de administración oral facilita el manejo y la distribución de ésta en los animales. Así Chabalgoty *et al.*, (1997) trabajando con la vacuna de *Echinococcus granulosus* expresada en una cepa de salmonella en ratones, obtuvieron mayor respuesta de anticuerpos en los animales vacunados oralmente.

La inmunidad frente a la infección de larvas de tenia en las primeras etapas de la infección es mediada principalmente por anticuerpos (Blundell *et al.*, 1968; Blundell *et al.*, 1969). Estudios previos han demostrado que los anticuerpos circulantes generados contra los productos metabólicos de metacéstodos, durante las primeras etapas de la infección, son protectivos. Así, en la *T. solium*, uno de esos antígenos inmunogénicos es el Tso18, el cual es un producto metabólico producido durante la etapa de oncósfera del parásito y que ha demostrado tener un efecto protector al ser usado como antígeno recombinante (Flisser *et al.*, 2004; González *et al.*, 2005).

El uso de cepas vacunales recombinantes atenuadas de *Salmonella typhimurium* (RASV) para introducir antígenos heterólogos, tiene ciertas ventajas en comparación al uso del antígeno aislado. Una de las ventajas es que la producción del antígeno

recombinante por la bacteria disminuye la necesidad de utilizar un adyuvante para mejorar la respuesta inmune de éste. Otra ventaja, es que no es necesaria la producción en laboratorio o la purificación del antígeno inmunogénico. Finalmente, la capacidad de Salmonella para colonizar los tejidos linfoides intestinales le permite estimular la respuesta inmune de la mucosa como de la humoral (Spreng *et al.*, 2006).

En un estudio paralelo a este (Silva, 2010) se logró demostrar que el antígeno protector Tsol18 de *T. solium* puede ser expresado en una cepa vacunal viva de Salmonella. Para ello se clonó genes Tsol18 maduros, que codifican para una proteína de 113 aminoácidos, en un plásmido recombinante que albergaba el sistema de secreción de β -lactamasas y se transformó en una cepa de Salmonella entérica serovar Typhimurium χ 9402 Δ crp, Δ cya.

La respuesta inmune a antígenos heterólogos y propios de la Salmonella depende de la capacidad de la RASV para replicarse y persistir en las células huésped. Otro factor importante en la generación de respuestas inmunitarias específicas, es la estabilidad del plásmido recombinante (Galen y Levine, 2001). Nuestra construcción vacunal fue bien tolerada por los lechones, y fue capaz de inducir una respuesta inmune específica contra Tsol18 en ambos grupos de animales vacunados.

El suero de animales inmunizados con la cepa RASV reaccionó con Tsol18 purificada, lo que sugiere la entrega exitosa del antígeno y la inducción de respuesta inmune humoral. La capacidad de χ 9402 cepa (pYA3620-Tsol18) para producir Tsol18 en concentraciones inmunogénica fue probablemente un elemento importante de su capacidad para obtener alto nivel de respuesta de IgG específica para Tsol18. Los niveles mas altos de IgG específica contra Tsol18 se encontraron en el día 55 después de la inmunización y la concentración de anticuerpos fue de 0.7740ul/mg IgG. La concentración de anticuerpos específicos de Tsol18 disminuye rápidamente.

A pesar que nuestro desafío no logró una protección del 100% en los animales vacunados como se informó anteriormente con otro sistema de la vacuna (Flisser *et al.*, 2004; González *et al.*, 2005), esta redujo significativamente ($P < 0.05$) el número de quistes sanos en los animales vacunados con una dosis única de RASV. Las reducciones tanto de la cantidad de cisticercos viables como de la capacidad de evaginar, son de

importancia epidemiológica, ya que son la fuente de infección humana. Sólo hubo un animal sin cisticercos viables, sin embargo, los cisticercos sanos que se encontraron en los demás cerdos vacunados tuvieron bajos niveles de evaginación, los cuales llegaron a 0% en dos casos.

En líneas generales, la vacuna recombinante usada en este experimento, a pesar de conseguir niveles de protección significativos, resultó ser menos protectora que la vacuna que utiliza el antígeno recombinante Tsol18 aislado.

NIVELES DE ANTICUERPOS

El análisis serológico utilizando el FAST-ELISA indica que los cerdos vacunados respondieron a la inmunización a través de un alza de anticuerpos específicos (IgG), mientras que en los no vacunados no se observa alza perceptible de anticuerpos. La gran ventaja del FAST-ELISA utilizado en este estudio, es que al ser es un ensayo cuantitativo, permite obtener además de la curva del alza de anticuerpos, su cuantificación, resultados que no se obtienen en pruebas utilizadas anteriormente.

Como cualquier otro ensayo de cuantificación de unión al ligando, este requiere que todos los reactivos sean utilizados en exceso, con excepción del que va a ser medido (en este caso del suero porcino), y que la actividad de la enzima sea estimada cuando la cantidad de sustrato presente sea mucho mayor que la cantidad de la enzima en la reacción (Avrameas, 1976; Avrameas, 1983; Hancock y Tsang, 1986). El FAST-ELISA utiliza una curva estándar para determinar los niveles de reacción de las muestras. Esta curva es expresada en unidades de concentración. El uso de la curva estándar también permite utilizar una única dilución de los sueros y comparar los resultados de un laboratorio a otro cuando se está utilizando una curva de nivel equivalente (Hancock y Tsang, 1986).

El FAST-ELISA en este estudio capaz de detectar anticuerpos específicos anti Tsol18 de protección en los animales vacunados y seguir la respuesta inmune hasta 105 días después de la vacunación. La mayor concentración de IgG específica fue encontrada el día 55. Se puede concluir por lo descrito anteriormente que el FAST-ELISA es una técnica de mucha utilidad para monitorizar la respuesta inmune en

animales vacunados en campo, y de esta manera determinar si están protegidos efectivamente. Así, también ayudar a analizar mejor las respuestas de estudios que se realicen en diferentes localidades y poder comparar las respuestas a la vacuna de una manera más exacta.

VI. CONCLUSIONES

Mediante este estudio se concluye:

La inmunización de los cerdos con la vacuna produce un alza en la producción de anticuerpos de IgG específicos para el antígeno vacunal.

Los niveles de anticuerpos producidos por la vacuna recombinante de cisticercosis porcina muestran un comportamiento cuadrático, teniendo su nivel más alto (0.774ul/mg IgG) al día 55.

La vacuna utilizada en dosis única disminuye la presencia de cisticercos sanos en la carcasa de los cerdos vacunados e infectados con un proglótido de *T. solium*

La vacuna utilizada en dosis única disminuye la viabilidad de cisticercos sanos encontrados en la carcasa de los cerdos vacunados e infectados con un proglótido de *T. solium*.

La vacuna recombinante de cisticercosis porcina provee un alto nivel de protección (96.1%) en los cerdos vacunados.

Es posible utilizar cepas atenuadas de Salmonella como vector vacunal de la cisticercosis porcina.

VII. RECOMENDACIONES

Luego de evaluar la respuesta inmune producida en cerdos tras la aplicación de una dosis de vacuna recombinante de cisticercosis porcina se recomienda:

Realizar posteriores trabajos para aumentar el nivel de protección de la vacuna y así disminuir también la presencia de cisticercos en la carcasa de los cerdos.

Probar el uso de una segunda dosis de la vacuna para ver si de esta manera se produce algún aumento en la protección de los animales y la disminución de quistes en la carcasa.

Realizar estudio aplicando una mayor dosis de la vacuna con la finalidad de verificar si se puede conseguir una protección mayor con el uso de una sola dosis de vacuna.

Probar el uso de otra cepa de salmonella atenuada o especie, como por ejemplo, *Salmonella cholerasuis*.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Acha P, Szyfres B. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales-. Tomo III. Tercera edición. OPS. Washington DC. EUA. 171-173; 222-224p.
2. Allan JC, Velasquez-Tohom M, Torres-Alvarez R, Yurrita P, Garcia-Noval J. 1996. Field trial of the coproantigen-based diagnosis of *Taenia solium* taeniasis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 54: 352–56
3. Allan J. 1999. Detection of *Taenia solium* antigens in feces. En: Teniasis/Cysticercosis by *Taenia solium*. 2da ed. H.H. García y S.M. Martínez (eds). Ed. Universo, Lima. Perú. 59-66p.
4. Arriola C. 2004. Efecto de la vacunación con antígeno secretorio/excretorio de oncosferas activadas de *Taenia solium* en cerdos infectados experimentalmente. Tesis de Médico Veterinario. Lima Univ. Nac. Mayor de San Marcos
5. Avrameas, S. 1976. Immunoenzymic techniques for biomedical analysis. *Methods Enzymol* 44: 709-17.
6. Avrameas, S. 1983. Enzyme immunoassays and related techniques: development and limitations. *Curr Top Microbiol Immunol* 104: 93-9.
7. Blundell S, Gemmell M, Macnamara F. 1968. Immunological responses of the mammalian host against tapeworm infections. VI. Demonstration of humoral immunity in sheep induced by the activated embryos of *Taenia hydatigena* and *T. ovis*. *Exp Parasitol* 23:79-82.

8. Blundell S, Gemmell M, Macnamara F. 1969. Immunological responses of the mammalian host against tapeworm infections. VIII. Some evidence against cellular immunity induced in dheep by activated embryos of *Taenia hydatigena* and *T. ovis*. *Exp Parasitol* 24:291-298.
9. Bryan, R. 1992. Current issues en cysticercosis: proteins, proglottids, pigs, and privies. En: *Global infectious diseases: prevention, control, and eradication*. Walker, D. H. (ed) Vienna: Springer-Verlag. 181-203p.
10. Carabin, H, Krecek R, Cowan L, Michael L, Foyaca-Sibat H, Nash T, Willingham A. 2006. Estimation of the cost of *Taenia solium* cysticercosis in Eastern Cape Province, South Africa. *Trop Med Int Health* 11: 906-16.
11. [CDC] Centers for disease control and prevention, 1993. Morbidity and mortality weekly report Recommendations and Reports: Recommendations of the International Task Force for Disease Eradication. Vol.42, No RR-16
12. Chabalgoity J, Harrison J, Esteves A, Demarco de Hormaeche R, Ehrlich R, Khan C, Hormaeche C. 1997. Expression and immunogenicity of an *Echinococcus granulosus* fatty acid-binding protein in live attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Infect Immun* 65: 2402-12.
13. Chatel G, Gulletta M, Scolari C, Bombana E, El-Hamad I, Matteelli A, Carosi G. 1999. Neurocysticercosis in an Italian traveler to Latin America. *Am J Trop Med Hyg* 60, 255-6.
14. Chatfield S, Roberts M, Li J, Starns A, Dougan G. 1994. The use of live attenuated *Salmonella* for oral vaccination. *Dev Biol Stand* 82: 35-42.
15. Cordero del Campillo M, Hidalgo-Argüello M. 1999. Cisticercosis (*C. Cellulosae*). En: *Parasitología veterinaria*. Cordero del Campillo y F. A. Rojo (eds). Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid-España. 493-495p.
16. Cuetter A, Guerra L, Meza A, Brower R. 1992. Neurocysticecosis: a special problem in the southwestern United States. *J. Trop. Geogr. Neurol*. Vol 2 172-176p.
17. Cysticercosis Working Group in Peru. 1993. The marketing of cysticercotic pigs in the sierra of Peru. *Bulletin of the World Health Organization* 71:223-228
18. De Lourdes M, Torres M, Correa D, Flisser A, Sosa-Lechuga A, Velasco O, Mesa-Lucas A, Plancarte A; *et al.* 1999. Prevalence and risk of cysticercosis and taeniasis in an urban population of soldiers and their relatives. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(3) 386-389p.

19. Del Brutto O. 1999. Neurocisticercosis. *Revista de neurología* 29(5): 456-466.
20. Dougan G, Smith L, Heffron F. 1989. Live bacterial vaccines and their application as carriers for foreign antigens. *Adv Vet Sci Comp Med* 33: 271-300.
21. Enseñat J, Martínez-Mañas R, Horcajada J, De Juan C, Ferrer E. 2007. Dificultades diagnósticas y terapéuticas en la neurocisticercosis: presentación de 6 casos y revisión de literatura. *Neurocirugía* 18: 101-110.
22. Falcón N. 2006. Efecto de la edad en un modelo de infección experimental de cisticercosis porcina. Tesis para optar el grado académico de Magíster en Salud Animal. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 10-11p
23. Fleury A, Escobar A, Chavarria A, Carrillo-Mezo R, Scitutto E. 2006. Cisticercosis en el Ser Humano. En: *Cisticercosis: guía para profesionales de la salud*. Primera Edición. C. Sarralde y A. de Aluja. (eds.). Fondo de Cultura Económica. México. 41-86p.
24. Flisser A. 2006. Where are the tapeworms? *Parasitology International* Vol. 55: S117-S120.
25. Flisser A. 1988. Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitol Today* 4: 131-7.
26. Flisser A. 1994. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. *Prog Clin Parasitol* 4: 77-116.
27. Flisser A, Plancarte A, Avila. 1999. Application of diagnostic methods for cisticercosis and taeniosis to epidemiological studies. En: *Teniasis/Cysticercosis by Taenia solium*. 2da ed. H.H. García y S.M. Martínez (eds). Ed. Universo, Lima. Perú. 39-50p.
28. Flisser A, Lightowers M. 2001. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96:353-6.
29. Flisser A, Sarti E, Lightowers M, Schantz P. 2003. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Trop* 87: 43-51.
30. Flisser A, Gauci C, Zoli A, Martinez-Ocana J, Garza-Rodriguez A, Dominguez-Alpizar J, Maravilla P, *et al.* 2004. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infect Immun* 72: 5292-7.

31. Flisser A, Rodriguez-Canul R, Willingham A, 3rd. 2006. Control of the taeniosis/cysticercosis complex: future developments. *Vet Parasitol* 139: 283-92.
32. Galen J, Levine M. 2001. Can a 'flawless' live vector vaccine strain be engineered? *Trends Microbiol* 9, 372-6.
33. Garcia H, Talley A, Gilman R, Zorrilla L, Pretell J. 1999. Epilepsy and neurocysticercosis in a village in Huaraz, Peru. *Clin Neurol Neurosurg* 101: 225-8.
34. Garcia H, Gonzalez A, Gilman R. 2003a. Diagnosis, treatment and control of *Taenia solium* cysticercosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16:411-419.
35. Garcia H, Gonzalez A, Evans C, Gilman R. 2003b. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet* 362: 547-56.
36. Garcia H, Del Brutto O. 2005. Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. *Lancet Neurol* 4:653-61.
37. Garcia H, Del Brutto O, Nash T, White A Jr., Tsang V, Gilman R. 2005. New concepts in the diagnosis and management of neurocysticercosis (*Taenia solium*). *Am J Trop Med Hyg* 72: 3-9.
38. García H, González A, Gilman R, Moulton L, Verastegui M, Rodríguez S, Gavidia C, Tsang V, *et al.* 2006. Combined human and porcine mass chemotherapy for the control of *T. solium*. *Am. J. Trop. Hyg.* 74(5), 850-855p.
39. García H, González A, Del Brutto O, Tsang V, Llanos F, Gonzalvez G, Romero J, Gilman R. 2007. Strategies for the elimination of taeniasis/cysticercosis. *Journal of the Neurological Sciences* 262 153-157.
40. Gentschev I, Dietrich G, Spreng S, Kolb-Mäurer A, Brinkmann V, Grode L, Hess J, Kaufmann S, Goebel W. 2001. Recombinant attenuated bacteria for the delivery of subunit vaccines. *Vaccine* 19: 2621-2628
41. Gilman R, García H, González A, Dunleavy M, Verastegui M, Evans C, Cysticercosis Working Group in Perú. 1999. Short cut to development: methods to control the transmission of cysticercosis in developing countries. En: *Teniasis/Cysticercosis by Taenia solium*. 2da ed. H.H. García y S.M. Martínez (eds). Ed. Universo, Lima. Perú. 313-324p.
42. González A, Cama V, Gilman R, Tsang V, Pilcher J, Chavera A, Castro M, Montenegro T. 1990. Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Perú. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43(2), 194-199 (90-083).

43. González A. 1993 Evaluación del diagnóstico de la cisticercosis porcina por los métodos de Electroinmunotransferencia (EITB), ELISA y Examen de Lengua. Tesis de Magíster en Microbiología. Lima, Univ. Nac. Mayor de San Marcos.
44. Gonzalez A, Garcia H, Gilman R, Lopez M, Gavidia C, McDonald J, Pilcher J, Tsang V. 1995. Treatment of porcine cysticercosis with albendazole. *Am J Trop Med Hyg* 53: 571-4.
45. González A, García H, Gilman R, Gavidia C, Tsang V, Bernal T, Falcón N, Romero M., *et al.* 1996. Effective, single-dose treatment of porcine cysticercosis with oxfendazole. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54(4) 391-394.
46. González, A.; N. Falcón; C. Gavidia; H. García; V. Tsang; T. Bernal; M. Romero and R. Gilman. 1998. Time-Response curve of oxfendazole in the treatment of swine cysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59(5) 832-836.
47. González A, Gavidia C, Falcón N, Evans C, Bernal T, López-Urbina T, García H, Gilman R. 1999. Porcine cysticercosis: Epidemiology, diagnosis and treatment. En: *Teniasis/Cysticercosis by Taenia solium*. 2da ed. H.H. García y S.M. Martínez (eds). Ed. Universo, Lima. Perú. 97-115p.
48. Gonzalez A, Gavidia C, Falcon N, Bernal T, Verastegui M, Garcia H, Gilman R, Tsang V. 2001. Protection of pigs with cysticercosis from further infections after treatment with oxfendazole. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65: 15-18.
49. Gonzalez A, Garcia H, GilmanR, Tsang V. 2003. Control of *Taenia solium*. *Acta Trop* 87: 103-9.
50. Gonzalez A, Gauci C, Barber D, Gilman R, Tsang V, Garcia H, Verastegui M, Lightowlers M. 2005. Vaccination of pigs to control human neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 72: 837-9.
51. Griffiths A, Wessler S, Lewontin R, Carrol S. 2008. An introduction to Genetic Analysis 9th Freeman and Company ed. USA. 800p.
52. Hancock K, Tsang V. 1986. Development and optimization of the FAST-ELISA for detecting antibodies to *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunological Methods* 92:167-176.
53. Handali S, Gonzalez A, Hancock K, Garcia H, Roberts J, Gilman , Tsang, V. 2004. Porcine antibody responses to *Taenia solium* antigens rGp50 and sTs18var1. *Am J Trop Med Hyg* 71: 322-6.
54. Harrison, G, Heath D, Dempster R, Gauci C, Newton S, Cameron W, Robinson C, Lawrence S, Lightowlers M, Rickard M. 1996. Identification and cDNA

- cloning of two novel low molecular weight host-protective antigens from *Taenia ovis* oncospheres. *Int J Parasitol* 26: 195-204.
55. Harrison L, Onyango-Abuje J, Sciutto E, Parkhouse R. 1999. Application of an antigen detection ELISA in the seroepidemiology of cysticercosis. En: *Teniasis/Cysticercosis by Taenia solium*. 2da ed. H.H. García y S.M. Martínez (eds). Ed. Universo, Lima. Perú. 255-260p
 56. Herrera G. 1999. Diagnosis of neurocysticercosis by computed axial tomography. En: *Teniasis/Cysticercosis by Taenia solium*. 2da ed. H.H. García y S.M. Martínez (eds). Ed. Universo, Lima. Perú. 69-73p
 57. Higashi G. 1988. Vaccines for parasitic diseases. *Ann. Rev. Public Health*. 9: 483-501.
 58. Kotton, C, Hohmann E. 2004. Enteric pathogens as vaccine vectors for foreign antigen delivery. *Infection and Immunity* 72: 5535-5547.
 59. Lee A, Engels D. 2006. Control of *Taenia solium* cisticercosis/Taenosis En: Molyneux D Ed. *Advances in parasitology: Control of human diseases*. Vol 61. 1Ed. UK. Elsevier p 509-551
 60. Leman A, Straw B, Glock R, Mengeling W, Penny R, Scholl E. 1986. *Diseases of swine*. 6 ed. Iowa. Iowa State University Pres.
 61. Lightowlers M. 1999. Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. *Int J Parasitol* 29: 811-7.
 62. Lightowlers M, Flisser A, Gauci C, Heath D, Jensen O, Rolfe R. 2000. Vaccination against cysticercosis and hydatid disease. *Parasitol Today* 16: 191–96
 63. Lightowlers M, Gauci C, Chow C, Drew D, Gauci S, Heath D, Jackson D, Dadley-Moore D, Read A. 2003. Molecular and genetic characterisation of the host-protective oncosphere antigens. *International Journal for Parasitology* 33:1207-1217.
 64. Loo L, Braude A. 1982. Cerebral cysticercosis in San Diego. A report of 23 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 61, 341-59.
 65. Martínez-Ocaña J, Gauci C, Lightowlers M, Perez-Tamayo R, Flisser A. 2006. Inmunolocalización de los péptidos recombinantes protectores Tsol18 y Tsol 45 en los tres estadios de desarrollo de *Taenia solium* y el adulto de *Taenia saginata*. En: XXVI Congreso Nacional SMB. Guanajuato: Sociedad Mexicana de Bioquímica

66. Minichiello V. 2002. New Vaccine Technology- What do you need to know?.
Journal of the Academy of nurse practitioners 14:2 73-81
67. Náquira J. 1999. *Taenia solium*: Biological cycle and Characteristics. En:
Teniasis/Cysticercosis by *Taenia solium*. 2da ed. H.H. García y S.M. Martínez
(eds). Ed. Universo, Lima. Perú. 7-14p.
68. Nayak A, Tinge S, Tart R, McDaniel L, Briles D, Curtiss R 3rd. 1998. A live
recombinant avirulent oral Salmonella vaccine expressing pneumococcal surface
protein A induces protective responses against Streptococcus pneumoniae. Infect
Immun 66, 3744-51.
69. OMS/OPS. 1993. Epidemiología y control de la teniasis y cysticercosis en
America Latina. In: WHO (Ed). WHO.
70. Pal D, Carpio A, Sander J. 2000. Neurocysticercosis and epilepsy in developing
countries. J. Neurol. Neurosurg Psychiatry. Vol 68 137-143p
71. Pawlowski Z. 2002. *Taenia solium*: Basic biology and Transmission. En: *Taenia
solium* Cysticercosis from basic to clinical science. First Edition. Gagandeep, S;
S. Prabhakar(eds). Wallingford: CABI publishing.1-11p
72. Phiri I, Ngowi H, Afonso S, Matenga E, Boa M, Mukaratirwa S, Githigia S,
Saimo M, et al. 2003. The emergence of *Taenia solium* cysticercosis in Eastern
and Southern Africa as a serious agricultural problem and public health risk.
Acta Trop 87: 13-23.
73. Price C, Kieny M. 2001. Vaccines for parasitic diseases. Current Drug Targets-
Infectious Disorders 1:315-324.
74. Rajshekhar V, Joshi D, Doanh N, van De N, Xiaonong Z. 2003. *Taenia solium*
taeniosis/cysticercosis in Asia: epidemiology, impact and issues. Acta Trop 87:
53-60.
75. Reyes, H. 1994. Cisticercosis. En: Parasitología Clínica. Tercera Parte. Capítulo
42. A. Atías (ed). Tercera Ed. Publicaciones Técnicas Mediterraneo. Santiago –
Chile. 333-359p.
76. Rivera A. 2006. Detección de *Taenia solium* por coproantígeno y su
comparación con microscopía tradicional. Tesis Químico-biológico. Guatemala:
Univ. San Carlos. 52 p.
77. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory
manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor-New York.

78. Sánchez A. 2008. ¿Que hay de nuevo en las teniasis-Cisticercosis? En: Conferencia electronica “Zoonosis parasitarias: Teniasis-Cisticercosis”. Red de helmintología para América latina y el caribe.
79. Sarti E, Rajshekhar V. 2003. Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. *Acta Trop* 87: 137-43.
80. [SCCBEP/EBBEP] Santa Clara County Biotechnology Education Partnership/Eastbay biotechnology Education Program. Fundamentals of Gene Regulation and the Arabinose Operon. [18 Enero 2011] Disponible: <http://www.ebbep.org/docs/pglo/operon.pdf>
81. Schantz P, Moore A, Munoz J, Hartman B, Schaefer J, Aron A, Persaud D, Sarti E, Wilson M, Flisser A. 1992. Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish community in New York City. *N Engl J Med* 327: 692-5.
82. Schantz, P. 2006. Progress in diagnosis, treatment and elimination of echinococcosis and cysticercosis. *Parasitology International* 55 S7-S13.
83. Scharf D. 1998. Neurocysticercosis. Two hundred thirty-eight cases from a California Hospital. *Arch Neurol.* 45: 777-780.
84. Scheel C, Handali S, Bueno E, Khan A, Hancock K, Gonzalez A, Garcia H, Gilman, *et al.* 2006. Development of a normal human immunoglobulin G standard curve for enzyme-linked immunosorbent assay: use for comparison of antigen efficacy. *J Immunoassay Immunochem* 27, 173-81.
85. Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Lacleste J, Sotelo J, Aluja A, Vargas L, Larralde C. 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect* 2: 1875-90.
86. Shata M, Stevceva L, Agwale S, Lewis G, Hone D. 2000. Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors. *Molecular Medicine Today* 6: 66-71.
87. Silva M. 2004. Modelo de infección experimental oral para cisticercosis porcina por *Taenia solium*. Tesis de Médico Veterinario. Lima. Univ. Nac. Mayor de San Marcos.
88. Silva M. 2010. Development of a recombinant attenuated salmonella vaccine system for *Taenia solium* cisticercosis in pigs. Tesis Doctoral. USA. Georgia State University.
89. Soulsby E. 1987. Parasitología y Enfermedades parasitarias de los animales domésticos. 7ma edición. Nueva editorial interamericana. México DF. 85-113p.

90. Spreng S, Dietrich G, Weidinger G. 2006. Rational design of Salmonella-based vaccination strategies. *Methods* 38, 133-43.
91. Swindle M. 1998. Surgery, anesthesia, and experimental techniques in swine. 1ra ed. USA. Iowa State University Press. 329p.
92. Takayanagui O, Odashima N. 2005. Clinical aspects of neurocysticercosis. *Parasitology International*. Vol. 55 S111-S115.
93. Tsang, V; J. Brand and A. Boyer. 1989. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *The Journal of Infectious Diseases*. Vol, 159(1) 50-59.
94. Tsang V, Brand J, Boyer A. 1989. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis* 159, 50-9.
95. Tsang V, Greene R, Pilcher J. 1995. Optimization of the covalent conjugating procedure (NaIO₄) of horseradish peroxidase to antibodies for use in enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunoassay* 16, 395-418.
96. [WHO] World Health Organization. 2011. Initiative for Vaccine Research (IVR) Parasitic Diseases. [Internet], [2 febrero 2011] Disponible en: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index.html
97. Wilkins P, Allan J, Verastegui M., Acosta M., Eason A, Garcia H, Gonzalez A, Gilman R, *et al.* 1999. Development of a serologic assay to detect *Taenia solium* taeniasis. *Am J Trop Med Hyg* 60, 199-204.
98. Willms K, Vargas-Parada L, Lacleste J. 2006. Biología del Parásito. En: *Cisticercosis: guía para profesionales de la salud*. Primera Edición. C. Sarralde y A. de Aluja. (eds.). Fondo de Cultura Económica. México. 19-40p.
99. Willms K, Sotelo J. 2001. Cestodes En: S Gillespie & Richard D. Pearson, eds. *Principles and Practice of Clinical Parasitology*. England: Wiley p.613-627

IX. APÉNDICE

Apéndice 1. Ficha de necropsia

FICHA DE NECROPSIA

Nº del animal

--

Nº DE FICHA:

FECHA DE NECROPSIA:

FECHA DE TRATAMIENTO:

RESPONSABLE:

SEXO: Hembra () Macho entero () Macho castrado ()

PESO:

GRUPO DE TRATAMIENTO:

Grupo 1	Grupo 2

OBSERVACIONES:

Apéndice 2. Tabla de conteo específico de quistes y evaginación

ORGANO	QUISTES			OBSERV.
	SANOS	DEGENER	TOTAL	
Pierna Izquierda				
Pierna Derecha				
Brazo Izquierdo				
Brazo Derecho				
Cabeza				
Costillas				
Corazón				
Lengua				
Cerebro				
Otros (Sacro-Columna)				
TOTAL				

EVAGINACIÓN:

ÓRGANO	EVAGINADOS	EVALUADOS	PORCENTAJE

HISTOPATOLOGÍA (PBS formolado al 12%):

Se obtuvieron muestras: Si () No ()

Enviado: Si () No ()

Código	Tejido	Lesión Anatomopatológica (Macro)	Observaciones

PRESENCIA DE OTROS PARÁSITOS:

PARÁSITO	NO TIENE	TIENE
<i>C. Tenuicollis</i>		
<i>Q. Hidatico</i>		
<i>F. hepática</i>		

SANGRADO EN VACUTAINER O BOLSA:Si () No () (Especificar porqué **NO** en observación)

Para: Suero () Plasma ()

CÓDIGO DE LA MUESTRA:

CONTEO DE QUISTES

Nº de Arete: _____ Miembro/Órgano
 Nº de Ficha: _____ Peso de muestra _____ Fecha: _____

Quistes sanos:	
Histopatología:	Total:
Observaciones:	
Quistes Degenerados:	
Histopatología:	Total:
Observaciones:	
Quistes Cicatrizales:	
Histopatología:	Total:
Observaciones:	
Petequias:	
Histopatología:	Total:
Observaciones:	
Responsable:	

CONTEO DE QUISTES

Nº de Arete: _____ Miembro/Órgano:
 Nº de Ficha: _____ Peso de muestra _____ Fecha: _____

Quistes sanos:	
Histopatología:	Total:
Observaciones:	
Quistes Degenerados:	
Histopatología:	Total:
Observaciones:	
Quistes Cicatrizales:	
Histopatología:	Total:
Observaciones:	
Petequias:	
Histopatología:	Total:
Observaciones:	
Responsable:	

Apéndice 3. Número de cisticercos hallados en la necropsia de animales clasificado por miembro y órgano inspeccionado

Animal	Pierna Izq.		Pierna Der.		Brazo Izq.		Brazo Der.		Cabeza		Costillas		Corazón		Lengua		Cerebro		Sacro/ columna		Total	
	CV	CM	CV	CM	CV	CM	CV	CM	CV	CM	CV	CM	CV	CM	CV	CM	CV	CM	CV	CM	CV	CM
9486 ^V	16	7	36	7	23	3	43	4	1	3	30	40	1	4	0	0	0	0	31	8	181	76
9494 ^V	2	2	3	1	0	1	9	0	0	1	7	6	0	0	0	0	0	0	7	2	28	13
9491 ^V	0	28	0	35	2	75	1	29	0	0	0	83	0	1	0	0	0	0	1	85	4	336
9268 ^V	8	1	11	2	16	0	21	0	2	1	20	0	2	4	2	3	0	0	10	1	92	12
9490 ^V	1	1	6	1	8	0	10	0	1	0	13	1	0	0	0	1	0	0	33	0	72	4
9489 ^V	1	1	2	4	9	7	4	8	2	0	5	9	0	5	0	2	0	0	2	5	25	41
9272 ^V	1	1	0	4	2	6	8	5	2	1	0	4	0	0	0	1	0	0	1	3	14	25
9270 ^V	1	1	0	16	0	14	0	9	0	7	0	18	0	11	0	5	0	0	0	31	1	112
9500 ^N	1	1	33	40	70	37	33	10	3	11	75	84	4	30	3	17	0	0	56	62	278	292
9499 ^N	1	1	187	6	217	7	225	0	126	4	482	70	36	10	45	11	7	0	670	34	1996	143
9273 ^N	1	1	20	12	67	3	83	7	10	4	22	28	0	6	5	0	3	0	103	31	314	92
9269 ^N	1	1	48	1	182	10	92	3	8	0	125	11	1	0	3	3	0	0	188	11	648	40
9497 ^N	1	1	1	8	2	7	5	2	0	0	2	9	0	6	0	5	0	0	4	13	15	51
9495 ^N	1	1	1	2	0	4	0	3	0	4	0	1	0	6	0	1	0	0	0	15	2	37
9496 ^N	1	1	172	1	641	4	783	3	71	0	782	11	96	1	77	0	40	0	679	1	3342	22
9498 ^N	1	1	188	3	545	0	538	6	51	3	672	3	14	5	39	9	15	0	787	4	2850	34

CV: Cisticercos vivos, CM: Cisticercos muertos

V: animal vacunado, N: animal no vacunado

