Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

Caracterización de las fracciones antigénicas del fluido vesicular de cisticerco de *Taenia solium* por ELISA e Inmunoblot

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biotecnología

AUTOR

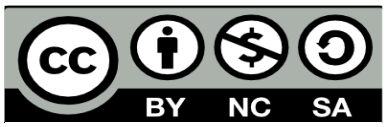
Eduardo Renato AYALA SULCA

ASESOR

Mg. Oscar ACOSTA CONCHUCOS

Lima, Perú

2023



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

Ayala E. Caracterización de las fracciones antigénicas del fluido vesicular de cisticerco de *Taenia solium* por ELISA e Inmunoblot [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Eduardo Renato Ayala Sulca
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07578096
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-4055-9779
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Oscar Acosta Conchucos
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	09456570
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-1912-0251
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Juan Atilio Jiménez Chunga
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06281952
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Javier Saul Cordova Ramos
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43479904
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Edwin Hualpa Cutipa
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	42952898

Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.5.1. Bases moleculares de enfermedades multifactoriales y emergentes
Grupo de investigación	Genética, Ómicas, Bioinformática y Desarrollo Computacional en Biomedicina, Farmacia, Toxicología y Alimentos – GENOBIDC
Agencia de financiamiento	Perú. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Instituto Nacional de Salud. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Jesús María Latitud: -12.0801992 Longitud: -77.0424256 Edificio: Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica – UNMSM País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Calle: Jr. Puno N°1002 Latitud: -12.05572 Longitud: -77.02324
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Abril 2009 – marzo 2010
URL de disciplinas OCDE	Farmacología, Farmacia https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

Siendo las **10:00 hrs. del 07 de julio de 2023** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado de tesis, presidido por el Dr.Juan AtilioJjiménez Chunga e integrado por los siguientes miembros: Mg. Oscar Acosta Conchucos (asesor), Ph.D. Javier Saul Cordova Ramos y el MSc. Edwin Hualpa Cutipa; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: "CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES ANTIGÉNICAS DEL FLUIDO VESICULAR DE CISTICERCO DE *TAENIA SOLIUM* POR ELISA E INMUNOBLOT", presentado por el Bachiller en Ciencias Biologicas **Eduardo Renato Ayala Sulca.**

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Biotecnología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado de la tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Muy Bueno (17)

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Ciencias Biologicas **Eduardo Renato Ayala Sulca**, el Grado Académico de Magíster en **Biotecnología.**

Siendo las 11.50 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 11.50 hrs. del 07 de julio de 2023

Dr. Juan Atilio Jiménez Chunga (P. P. D.E.)
Presidente

Mg. Oscar Acosta Conchucos (P.Asoc, T.C.)
Miembro - Asesor

Ph.D. Javier Saul Cordova Ramos (P. Asoc, T.C.)
Miembro

MSc. Edwin Hualpa Cutipa (P. Asoc., T.C.)
Miembro

Observaciones:

Jr. Puno 1002 – Lima 1
Apartado Postal 4559 Lima 1
Teléfono 619-7000 anexo 4812
Email:upg.farmacia@unmsm.edu.pe

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

EL DIRECTOR DE LA UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS QUE SUSCRIBE DEJA,

CONSTANCIA

00002-FFB-UPG-2021

Que mediante procedimiento de la evaluación de originalidad según Resolución Rectoral N° 043005-R-18, de la Tesis intitulada **"Caracterización de las Fracciones Antigénicas del Fluido Vesicular de Cisticerco de *Taenia solium* por ELISA e Inmunoblot",** presentado por **Eduardo Renato Ayala Sulca** con fecha de recepción 14/09/2020, con fecha de aplicación al programa de similitud el 03/02/2021 con el software utilizado el TURNITIN, con las configuración de exclusión de textos entrecomillas, bibliografías y cadenas menores a 40 palabras, mediante el procedimiento de la evaluación de originalidad, el porcentaje de similitud según programa detector es **3%**, por lo que, cumple los criterios de originalidad sin observación, según informe adjunto.

Se expide la presente constancia para el trámite de expedito, según lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado 2018, aprobado con RR. 04790-R-18.

Lima, 04 de febrero de 2021

UNMSM
Firmado digitalmente por JAVE NAKAYO Jorge Leonardo FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 05.02.2021 10:07:36 -05:00

DR. JORGE LEONARDO JAVE NAKAYO
DIRECTOR

JLJN/ecj

Agradecimientos:

A la UNMSM, Unidad de Posgrado de la facultad de Farmacia y Bioquímica - Maestría en Biotecnología, al jurado, a mi asesor y al personal docente, por su apoyo, por sus conocimientos impartidos y al personal administrativo por su apoyo.

Al INS-Perú, CNSP, Laboratorio de Referencia Zoonosis Parasitaria, y al personal por su apoyo en el trabajo de investigación.

A mis hermanos y padres QPD quienes estarían orgullosos por este logro. A mi familia esposa e hijos por su constante apoyo y estímulo para lograr mi superación.

A todos los que hicieron posible la culminación de mi estudio de Maestría en Biotecnología.

INDICE

Pág.

Resumen …… i

Abstract ..……... ii

Índice de Tablas ……. iii
Índice de Figuras …….……. …. iiii
Abreviaturas ……... iiiii

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN ……. 1

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO ……. 4

Antecedentes …….…….…… 4
Planteamiento del problema …… 6
Justificación de la investigación ……. 7
Objetivos ……. 8
Aspectos teóricos ……..…..… 8
Epidemiología de teniasis/cisticercosis ……. 11
Ciclo biológico o evolutivo de Taenia solium ……... 12
Síntomas, …… 15
Tratamiento …….……..... 16
Limitaciones …….….. 16

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA …… 17

Parte Experimental:
Obtención de LVC. *T.solium* …….. 18
Preparación del Ag. LVC. *T.solium* …….……... 20
Evaluación del Ag. LVC. T.solium ……. 21
Precipitación de proteínas con $(NH_4)_2SO_4$ 20%-OMS mejorado ... 21
Procedimiento ……. 22
Liofilización del antígeno semipurificado ……. 22
Cuantificación del Ag.LVC.T.solium …… 23
Ag.LVC. T.solium semipurificado para ELISA e IB (Protocolo).. 23
Control de calidad …….. 24
Selección del Panel de Sueros de Referencia (SCP, SCN) …… 24
Muestras de suero sanguíneo humano: ……..... 25
Procesamiento de datos: …… 25

Métodos inmunoserológicos para el diagnóstico de cisticercosis humana:
I.- Técnica de ELISA ……..... 26
Fundamento de la técnica ……. 26
Procedimiento ……..... 27
Lectura …….. 28
Técnica de NCM-ELISA .....……..... 28
Protocolo adaptado INS. 29

II.- Técnica de Inmunoblot (IB)…….. 29
Fundamento de la técnica ……... 30

Procedimiento:
Primera etapa
Proteínas antigénicas separadas electroforéticamente en gel de Poliacrilamida SDS-PAGE ……... 30
Gel de separación o de resolución (Gel inferior 15%) …… 30
Gel de empaquetamiento o de apilamiento (Gel superior, 5%).. 31
Antígeno (Ag) …… 31
Tratamiento de la muestra (Ag.LVC) …… 31
Preparación de la electroforesis ……... 31
Corrida electroforética ……... 32
Segunda etapa
Transferencia ……. 32
Preparación de la electroforesis para transferencia ……... 32
Corrida electroforética ……... 32
Preparación de la transferencia ……..... 33
Electrotransferencia ……... 33
Tercera etapa
Reacción inmuno enzimática o Prueba EITB (IB o WB) …. 33
Lectura …….. 34

CAPÍTULO IV. RESULTADOS ……. 35

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN…….…… 42

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES …… 46

RECOMENDACIONES ……... 48

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ……. 49

CAPÍTULO VIII. ANEXOS …… 55

ANEXO 1 …… 55
MÉTODOS Y OBTENCIÓN DE DATOS
Flujograma, Ficha Epidemiológica …….. 56 y 57
ANEXO 2 …… 58
REACTIVOS, LOWRY, CUANTIFICACIÓN PROTEICA
Método lowry ……..... 58
Interpretación de resultados …….. 59
Determinación del error estándar ……. 60
Cálculo de la Concentración proteica …….. 61
Determinación del Punto de Corte (Cut-off) …… 62
ANEXO 3 ……. 63 - 69
MÉTODOS INMUNOSEROLÓGICOS (ELISA, IB) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA CISTICERCOSIS HUMANA
ANEXO 4 …… 70
VALORES PREDICTIVOS
ANEXO 5 …… 71
GLOSARIO

RESUMEN

El trabajo de tesis tuvo como objetivo evaluar las fracciones antigénicas del líquido vesicular de cisticerco de *Taenia solium* (LVC.*T.solium*), y se comparó la sensibilidad y especificidad de ELISA e Inmunoblot (IB) en el diagnóstico de cisticercosis, utilizando antígenos sem ipurificados y totales.

El LVC.*T.solium* se obtuvo de cerdos parasitados de zonas endémicas (Huanta-Ayacucho, Huancayo-Junín, Huánuco, Ucayali), diagnosticados mediante examen de lengua. Los cisticercos se aislaron mediante disección y el líquido vesicular se obtuvo por aspiración con jeringa.

El material antigénico fue procesado en el laboratorio de Zoonosis Parasitaria Instituto Nacional de Salud. La evaluación del antígeno total semi purificado se realizó mediante las pruebas ELISA e Inmunoblot (IB), frente a pool de sueros positivos y negativos. Los datos fueron procesados mediante tablas de contingencia 2x2 con el programa IBM-SPSS.

El LVC.*T.solium* obtenido tuvo una concentración proteica máxima de 3,6 µg/µL (muestra Huancayo-M) y una concentración proteica mínima de 0,520 µg/µL (Huancayo, lengua). De 375 sueros, 66 (17,6%) resultaron ELISA positivos y de ellos, 14 (21,2%) fueron IB positivos. ELISA tuvo alta sensibilidad (100%) y baja especificidad (85,6%), el título de corte fue 0,125 y la dilución fue 1/1000. IB tuvo sensibilidad 95% y especificidad 100%. ELISA presentó reactividad cruzada con otras parasitosis como hidatidosis, fascioliasis, esquistosomiasis e *Hymenolepis nana*, y en IB corresponde al peso molecular (PM) inespecífico de 42-39KDa. Los anticuerpos de pacientes con cisticercosis reconocieron a uno o más de las 8 bandas diagnósticas específicas: 35, 31, 24, 2 3, 18, 17, 14 y 13KDa.

Se concluye que el antígeno del LVC.*T.solium* semi purificado evaluado con IB, reconoció de manera frecuente los polipéptidos o glicoproteínas de 67-61, 50, 42-40, 35, 31, 24, 23, 18, 17, 14 y 13 KDa, y a uno o más de las 8 bandas proteicas específicas de diagnóstico: 35, 31, 24, 23, 18, 17, 14 y 13 KDa, después de descartar los PM mayores a 35 KDa, lo que indica que las fracciones semi purificadas del LVC.*T.solium* tienen potencial para ser utilizados como antígenos para diagnóstico de cisticercosis.

***Palabras clave*:** Antígeno, cisticerco, *Taenia solium*, líquido vesicular de cisticercos.

ABSTRACT

The objective of the thesis work was to evaluate the antigenic fractions of the vesicular fluid of cysticercus of *Taenia solium* (LVC.*T.solium*), and the sensitivity and specificity of ELISA and Immunoblot (IB) in the diagnosis of cysticercosis were compared, using semi-purified and total antigens.

LVC.*T.sol.* was obtained from parasitized pigs from endemic areas (Huanta-Ayacucho, Huancayo-Junín, Huánuco, Ucayali), diagnosed by tongue examination. The cysticerci were isolated by dissection and the vesicular fluid was obtained by syringe aspiration.

The antigenic material was processed in the Parasitic Zoonosis laboratory of the National Institute of Health. The evaluation of the semi-purified total antigen was carried out using the ELISA and Immunoblot (IB) tests, against a pool of positive and negative sera. The data was processed using 2x2 contingency tables with the IBM-SPSS program.

The LVC.*T.solium* obtained had a maximum protein concentration of 3.6 µg/µL (Huancayo-Muscle sample) and a minimum protein concentration of 0.520 µg/µL (Huancayo, Tongue sample). Of 375 sera, 66 (17.6%) were ELISA positive and of these, 14 (21.2%) were IB positive. ELISA had high sensitivity (100%) and low specificity (85.6%), the cutoff titer was 0.125 and the dilution was 1/1000.

The LVC.*T.solium* obtained had a maximum protein concentration of 3.6µg/µL (Huancayo-M sample). Of 375 sera, 66 (17.6%) were ELISA positive and 14 (21.2%) were IB positive. ELISA had high sensitivity (100%) and low specificity (85.6%), with a 0.125 cutoff titer and 1/1000 dilution. IB had 95% sensitivity and 100% specificity. ELISA presented cross-reactivity with other parasitosis such as *hydatidosis, fascioliasis, schistosomiasis* and *Hymenolepis nana*, and in IB it corresponds to a non-specific molecular weight (MW) of 42-39KDa.

Antibodies from patients with cysticercosis recognized one or more of 8 specific diagnostic bands: 35, 31, 24, 23, 18, 17, 14, and 13KDa.

It is concluded that the semi-purified LVC.*T.solium* antigen evaluated with IB frequently recognized the polypeptides or glycoproteins of 67-61, 50, 42-40, 35, 31, 24, 23, 18, 17, 14 and 13 KDa, and to one or more of the 8 diagnostic specific protein bands: 35, 31, 24, 23, 18, 17, 14 and 13 KDa, after discarding PM greater than 35 KDa, which indicates that the semi-purified fractions of LVC.*T.solium* have the potential to be used as antigens for diagnosis of cysticercosis.

Key words: Antigen, cysticercus, *Taenia solium,* vesicular fluid of cysticeri.

ÍNDICE DE FIGURAS

Pg.

Figura 1.- Cisticerco (larva) y Adulto (*Taenia solium*) ...……... 13
Figura 2.- Ciclo biológico (Centro para el Control y Prevención de
Enfermedades o CDC.USA) …….…… 14
Figura 3.- Huevos de *Taenia solium* y evolución de la enfermedad …… 14
Figura 4.- Obtención del Líquido Vesicular de Cisticerco (LVC) de *T.solium* ... 19
Figura 5.- Liofilización del Ag. LVC-semi purificado de *T.solium (Anexo 1)*..... 54
Figura 6.A (Anexo 3).- Equipos para la prueba de ELISA ……...pg. 62
Figura 6.B.- Lectura ELISA (visual) ……pg. 36
Figura 6.C.- Lectura NCM- ELISA (visual) …….……pg. 36
Figura 7.- Lectura de la prueba de ELISA (Esquemática) ……... pg. 62
Figura 8.- NCM-ELISA del Ag.LVC. semi purificado …… .. pg. 62
Figura 9.- Preparación del gel (Superior – Inferior) …… pg. 64
Figura 10.- Preparación de la electroforesis ……...pg. 64
Figura 11.- Corrida electroforética ……...pg. 65
Figura 12.- Perfil proteic. Ag.LVC-semi purificado en gel poliacrilamida ….pg. 65
Figura 13.- Preparación y Transferencia de proteínas del gel poliacrilamida
a la membrana de nitrocelulosa (montaje y sandwich)…….pg.65
Figura 14.- Perfil electroforética (Ag.LVC. Mix semi purifiado) …….…. pg. 39
Figura 15.- Perfil electroforética (Ag.LVC.) ……. pg. 39
Figura 16.- Prueba IB para Diagnóstico cisticercosis humana con Ag.LVC.
T.solium reconocimiento de una o más bandas PM 13-35 KDa… pg. 40

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Cuantificación proteica del Ag.LVC.*T.solium* sem ipurificado …….pg.35
Tabla 2: Sensibilidad y Especificidad de la técnica o prueba de ELISA……. pg.37
Tabla 3: Sensibilidad y Especificidad de la técnica o prueba de ELISA e IB …..pg.37
Tabla 4: Prueba IB. Con Ag.LVC.T.sol.frente a sueros de pacientes sanos,
con cisticercosis y otras parasitosis ……..……... pg.41
Tabla 5: Concentrac.gel Empaquetamiento (5%) y gel Separación (12% y 15%).. pg.68
Tabla 6: Sensibilidad, Especificidad, VPP, VPN de ELISA e IB. …… ….. pg.70
Tabla 7: Datos específicos de S, E, VPP, VPN para ELISA e IB. …… pg. 70

ÍNDICE DE CUADROS:

Cuadro 1: Método Lowry …….……pg.58
Cuadro 2: Lectura (Absorbancia) ……...pg.59
Cuadro 3: Cálculos de BSA y Ag.LVC. …….pg.60

ÍNDICE DE GRÁFICOS:

Gráfico 1: Curva estándar (Lowry) ……..pg.60

ABREVIATURAS:

T. solium ……. *Taenia solium*

T/C …… *Teniosis/Cisticercosis*

Ag. …….. Antígeno

Ag. LVC.*T.solium* … Antígeno de líquido vesicular de cisticerco de *T.solium.*

ELISA …… Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

NCM-ELISA... Técnica de ELISA en membrana de nitrocelulosa

IB …… …….Inmunoblot

KDa. ……. Kilo Daltons

SPSS……... Programa estadístico para análisis de datos

mL. …….. mililitros

PM. …… … Peso Molecular

SP. ……. Suero problema

SCP. …….. Suero control positivo

SCN. …….. Suero control negativo

LVC ……. Líquido o fluido vesicular de cisticerco

PCR ……... Reacción en cadena de la polimerasa

NCC……... Neurocisticercosis

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

La teniasis/cisticercosis es considerada una zoonosis parasitaria y un gran problema de Salud animal y Salud Pública humana porque produce la neurocisticercosis (NCC) y puede causar la muerte. Esta zoonosis es endémica en el país, principalmente en las áreas rurales y suburbanas. La eficacia del tratamiento es variable y el pronóstico no es bueno, la sintomatología puede estar ausente o ser muy evidente.

La cisticercosis afecta la etapa productiva de la población (15 a 65 años), disminuyendo su capacidad laboral, produciendo pérdidas económicas a nivel nacional, regional y familiar, y con repercusión en las zonas endémicas. La cisticercosis es de distribución mundial, generalmente se presenta en regiones en vías de desarrollo, cuya situación socioeconómica, cultural y condiciones de salubridad ineficientes facilitan la transmisión de *Taenia solium (T. solium)* que, el estadio de larva es el agente causal de esta parasitosis.

Las pérdidas económicas en general se estiman en 2 a 3 millones de dólares al año [1]. En América Latina la pérdida económica anual correspondería aproximadamente a 164 millones de dólares americanos. La cisticercosis en el Perú produce una pérdida de 40 a 50 dólares por animal y habría una pérdida de más de 5 millones de dólares anuales por este motivo.

La teniasis es endémica en el Perú, especialmente en las zonas rurales y suburbanas. Esta zoonosis y otras como la hidatidosis, la fascioliasis, etc., están principalmente distribuidas en las zonas ganaderas de la sierra, donde la crianza libre del cerdo y la mala costumbre de defecar a campo abierto o mala eliminación de las excretas permite su presencia y difusión.

La teniasis se adquiere al ingerir la carne de cerdo mal cocida y parasitada con la larva o cisticercos de *T. solium*; mientras que la cisticercosis se adquiere al comer alimentos preparados en condiciones higiénicas inadecuados o contaminados con huevos de *T. solium*. En la cisticercosis, la tasa de infección de cerdos es alta, se estima en más del 20% y la infección humana por *T. solium* está alrededor del 1% [2].

Investigaciones previas en la Morgue Central y en las Unidades de Neurología de algunos establecimientos de salud de Lima, muestran un 0.72% de prevalencia [3] y recientemente se hallaron anticuerpos a cisticerco por *T. solium* en el 12% de pacientes con sintomatología, atendidos en diferentes hospitales de Lima [4] y en el 8% de la población en una zona endémica de la Selva [5]. En los servicios de Neurología y Neuropsiquiatría de Lima, los casos de neurocisticercosis ocupan 10-15% de camas y la mayor prevalencia se presenta en pacientes de la sierra central del país [4].

La sintomatología puede estar ausente o presentarse a nivel neurológico y/o psíquico, desde cefalea como único síntoma, hasta convulsiones tipo epilepsia, parálisis de pares craneales, hemiplejia, alteraciones visuales, etc.

La infección del sistema nervioso por la larva de *T. solium* es de gran importancia en el hombre, porque puede ocasionar incapacidad física o mental, inclusive la muerte, el tratamiento es complicado y no es bueno el pronóstico por lo difícil del diagnóstico clínico.

El diagnóstico puede ser parasitológico y/o serológico. Las pruebas coprológicas demuestran la presencia del parásito (huevos o proglótides) de *T. solium*, las pruebas serológicas más usadas incluyen ELISA y moleculares como Inmunoblot (IB) [6], reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otros que permiten demostrar la presencia del anticuerpo (por ELISA) y/o la proteína específica (por IB) presente en el suero del infectado.

En Estados Unidos para el diagnóstico de cisticercosis humana se utiliza un antígeno purificado de fluido vesicular de cisticerco de *T. solium* producido por Tsang del Center for Disease Control and Prevention (CDC), el cual posee siete glicoproteínas (GP), oligosacáridos tipo N asociados a proteínas antigénicas específicas, las que son utilizadas para el diagnóstico inmunoserológico confirmatoria de la neurocisticercosis.

Las fracciones antigénicas del fluido vesicular de cisticerco o larva de *T. solium* han mostrado mayor sensibilidad y especificidad que los antígenos totales [7, 8], por lo que pretendemos su aislamiento y caracterización inmunológica [9, 10].

Para el diagnóstico de la cisticercosis humana, específicamente la neurocisticercosis, son útiles el análisis por imágenes; sin embargo, el estudio inmunoserológico de los casos permite corroborar el diagnóstico, así como el estado vital del parásito.
Un gran porcentaje de casos con convulsiones, más conocido como epilepsia, es originado por la neurocisticercosis humana y es de las pocas zoonosis parasitarias que pueden ser erradicadas.

Las zoonosis parasitarias como la cisticercosis, hidatidosis, toxoplasmosis y fascioliasis que afectan a los peruanos son verificadas mediante el diagnóstico inmunoserológico indirecto y como toda prueba serológica tiene las limitaciones de su sensibilidad y especificidad.

Para el diagnóstico de la cisticercosis humana en nuestro país no contamos con antígenos LVC. *T. solium* (Ag.LVC. *T. solium*) purificados. En el Instituto Nacional de Salud del Ministerio de Salud (INS-MINSA) y en los laboratorios particulares se están utilizando antígenos totales.

Por otro lado, para realizar cualquier programa de control de cisticercosis se necesita del diagnóstico situacional, para lo cual es necesario técnicas serológicas como ELISA y moleculares como Inmunoblot y la PCR.

El estudio es de importancia en Salud Pública porque permitiría aislar las fracciones antigénicas del LVC y estudiarlas inmunológicamente, producir antígenos semipurificados en kits para las pruebas serológicas (ELISA) y tiras reactivas para pruebas moleculares de Inmunoblot (IB) con mayor sensibilidad y especificidad, de esa manera abaratar los costos y aplicarlas en la evaluación de intervenciones para la promoción, prevención y protección de la salud en diferentes grupos de la población afectada por esta zoonosis y ser utilizadas en la Red de Laboratorios del sector Salud, fuerzas armadas y/o laboratorios privados.
El objetivo de la investigación es evaluar las fracciones antigénicas del fluido vesicular de cisticerco de *Taenia solium* por serología (ELISA, IB), y determinar la sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la cisticercosis humana.

CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO

Antecedentes

Según la OPS-OMS (2019) [11], la teniasis-cisticercosis por *T. solium*, es una zoonosis parasitaria de distribución mundial y se presenta con mayor frecuencia en los países en vías de desarrollo (Latinoamérica, Asia y África), donde sus condiciones socioculturales y deficientes servicios de saneamiento ambiental facilitan su transmisión, cuya fase larvaria (cisticerco), es el agente causal de esta parasitosis. La crianza libre del cerdo y la mala costumbre de defecar a campo abierto o la mala eliminación de las excretas permite la presencia y difusión de esta enfermedad [11]**.** También produce pérdidas económicas a nivel familiar, regional y nacional [12].

Según la OMS (2018) [13], el Grupo de Epidemiología de Referencia sobre la carga de enfermedades de transmisión alimentaria el 2015 manifestó que**,** *T. solium* era una de las causas primordiales de muerte. Por otro lado**,** las personas que sufren neurocisticercosis, sintomáticos y asintomáticos, presentan cuadros de epilepsia cuya prevalencia se estima en 2,56 y 8,30 millones de personas. También, en el 2010, se incorporó la cisticercosis por *T. solium* como una enfermedad tropical desatendida, estableciendo dos objetivos principales: elaborar una estrategia validada para combatir y erradicar la teniasis/cisticercosis por *T. solium* y ampliar las intervenciones en algunos países endémicos hasta el 2020 [13]**.**

La cisticercosis es una enfermedad zoonótica parasitaria endémica en el mundo con excepción de Australia, países industrializados como EE. UU. con casos importados, no es frecuente en los países musulmanes porque el consumo de carne de cerdo está prohibido, por lo que no se conoce la real incidencia de cisticercosis humana y porcina a nivel mundial [14].

La neurocisticercosis afecta al hombre sin importar el sexo, la edad, ni la condición económica, se presenta con mayor incidencia entre los 30 y 50 años, con una prevalencia aproximada de 3,6% de la población en algunas regiones [14].

Una característica importante de la cisticercosis es que afecta el bienestar familiar y/o

regional en las zonas en vías de desarrollo, también la depreciación del valor comercial del ganado porcino y el riesgo para la salud al ingerir alimentos preparados con carne de porcino parasitado y/o mal cocida [13].

En el Perú esta zoonosis es endémica, especialmente en zonas rurales y suburbanas. La infección humana *por T. solium* está alrededor del 1%. Estudios realizados en algunos establecimientos de salud de Lima (Morgue Central y en las Unidades de Neurología), demostraron una prevalencia de 0.72%, se detectaron anticuerpos contra cisticerco de *T. solium* en 12% de pacientes con sintomatología y en 8% de la población total en una zona endémica de la selva. En los servicios de Neurología y Neuropsiquiatría de Lima, los casos de neurocisticercosis ocupan el 10-15% de las camas y la prevalencia es mayormente de la sierra central del país [11, 13, 15, 16.]

Córdova *et. al*, 2019, mencionó que el Perú era uno de los primeros países en prevalencia epidemiológica de la neurocisticercosis (NCC) en Latinoamérica, con 7.1%–26.9% [17].

La NCC es una manifestación del cisticerco en el sistema nervioso central (SNC) y principalmente se presenta en los países latinoamericanos, su expresión clínica es muy variable dependiendo de su localización, el número y estado evolutivo del parásito. Las manifestaciones clínicas frecuentes son los cuadros convulsivos conocidos como epilepsia y cefalea [18], generalmente se localiza en la región subaracnoidea y parenquimatosa. La cisticercosis subcutánea afecta al 0.9% de casos [14, 17].
Para el diagnóstico de laboratorio de la teniasis-cisticercosis, contamos con pruebas coprológicas que detectan *T. solium* y las serológicas para el diagnóstico de cisticercosis siendo las pruebas más utilizadas, ELISA como tamizaje y western blot o inmuno blot como confirmatoria [18, 19].

La prueba de ELISA con antígeno del extracto total, a pesar de su alta sensibilidad (92%) tiene baja especificidad (81 %), produce falsos positivos por las reacciones cruzadas que presenta *T. solium* con *hidatidosis (Echinococcus granulosus), teniasis* por *Hymenolepis nana*, *esquistosomiasis, fascioliasis* [18].

Escalante *et. al* (1995)[10] manifestaron que la prueba de Inmunoblot con antígeno purificado es utilizado por su alta sensibilidad (91%) y alta especificidad (100%) en la

detección inmunológica de anticuerpos IgG en suero de pacientes con cisticercosis [10, 19].

En un estudio realizado el 2015 en el Laboratorio de Zoonosis Parasitaria – INS/Perú con la prueba Electro Inmuno Transferencia *(*EITB*) o* «Inmuno blot» con antígeno de *T. solium* purificado se obtuvo casi 100% de sensibilidad y especificidad, y no se han observado falsos positivos y/o negativos [10, 20].
En otro estudio realizado en Perú, entre 1990 y 1995, con la técnica Inmuno blot en grupos poblacionales definidos, se demostraron seroprevalencias basales de 10 y 20% en la población general [16].

Actualmente en nuestro país para las pruebas inmunodiagnósticas se están utilizando antígeno homogenizado total o extracto de proteínas, por lo que es importante la obtención de fracciones antigénicas purificadas de líquido vesicular de cisticerco de *T. solium* (Ag.LVC.*T.solium*) para las pruebas de diagnóstico serológico, pues mediante su uso se mejoraría la sensibilidad y especificidad, como el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC- USA) [20, 21, 22] que utiliza antígeno purificado. Para realizar cualquier programa de control de cisticercosis se necesita del diagnóstico situacional, para lo cual es necesario técnicas serológicas como ELISA y moleculares como Inmunoblot entre otros.

El fluido del cisticerco o de la larva de *T. solium* contiene fracciones proteicas antigénicas más sensibles y específicas que otros componentes del parásito. También existe la presencia de otras proteínas antigénicas con propiedades inmunogénicas como las glicoproteínas del parásito [21], éstas se expresan en las estructuras parasitarias que están en contacto con el hospedero, así como en las células de la respuesta inflamatoria que circunda al cisticerco y que probablemente modulan la respuesta inmunológica [23].

Planteamiento del problema

En nuestro país el diagnóstico serológico de la cisticercosis humana se realiza con antígeno total mediante las pruebas serológicas de ELISA e Inmunoblot. El problema es que no contamos con material antigénico purificado ni semi purificado, por lo que es de importancia el aislamiento de las fracciones del antígeno del fluido o líquido vesicular del cisticerco de *Taenia solium* (Ag.LVC.*T.solium*) para posteriormente purificarla, y,

permitirá mayor especificidad y mayor sensibilidad [20, 21] de las pruebas mencionadas, por tanto estaríamos desarrollando una prueba de diagnóstico más confiable, más económico y práctico, orientado a la identificación de anticuerpos contra la larva o cisticerco y se ejecutarían otras pruebas como PCR, estudios genético moleculares e investigaciones serológicas y así poder evaluar cualquier programa de control. Además, la transferencia de estas tecnologías al Sector Salud y particulares para el diagnóstico y estudios epidemiológicos como un primer paso en la aplicación de medidas de control.

Existe alta prevalencia de la neurocisticercosis que afecta a la población peruana (1% a 12%) por lo que es necesario implementar técnicas serológicas de inmuno diagnóstico con alta sensibilidad y especificidad. Estudios realizados por "The Cysticercosis Working Group in Perú" entre otros, revelan que la prevalencia de cisticercosis en el Perú oscila entre 10 y 20% de la población en general [15].

Las fracciones antigénicas del fluido vesicular de cisticerco o larva de *T. solium* han mostrado mayor sensibilidad y especificidad que los antígenos totales, constituye uno de los primeros estudios realizados por Tsang en 1989 [21]

Con el estudio pretendemos el aislamiento, caracterización inmunológica de las fracciones antigénicas del fluido vesicular de la larva de *T. solium* por procedimientos inmunoserológicos, y utilizarlas en pruebas serológicas (ELISA e Inmunoblot) más sensibles y específicas.

La investigación permitirá plantear otros proyectos como es la producción de un kit de diagnóstico de la cisticercosis humana con material antigénico de LVC.*T.solium* nativo purificado y preparado en tiras reactivas para la prueba de Inmunoblot para su uso en la Red de Laboratorios Regionales de Salud y laboratorios particulares. También permitirá realizar estudios genéticos, entre otros.

Justificación de la investigación

El estudio es parte de un proyecto que incluye la producción de un kit de diagnóstico con antígenos purificados para la prueba de ELISA y con tiras reactivas para la prueba Western blot de mayor sensibilidad y especificidad y de menor costo y así poder aplicar

en la evaluación de intervenciones para la promoción de la salud en diferentes grupos afectados por esta zoonosis, transferir éstas tecnologías a la Red de Laboratorios Regionales del Sector Salud y a los laboratorios que lo requieran para el diagnóstico y estudios epidemiológicos como un primer paso en la aplicación de medidas de control.

También realizar otros proyectos de investigación para desarrollar antígenos recombinantes y aplicar otras pruebas genético-moleculares como la PCR.

Objetivos

Objetivo General:

Evaluar las fracciones antigénicas del fluido vesicular de cisticerco de *Taenia solium*, por serología (ELISA, IB) y determinar la sensibilidad y especificidad.

Objetivos Específicos:

1- Aislar las fracciones antigénicas del fluido vesicular de cisticerco de *Taenia solium* por electroforesis.

2- Determinar la sensibilidad y especificidad de los métodos serológicos ELISA e Inmunoblot (IB), para el diagnóstico de la cisticercosis humana, utilizando las fracciones antigénicas aisladas y el antígeno total.

Aspectos teóricos

El parásito es un helminto de la clase cestoda del género *Taenia* y puede infectar al hombre, localizándose en el intestino delgado.

El hombre desde la antigüedad ha padecido la enfermedad comúnmente conocida como "solitaria" producida por *T. solium*. Es una zoonosis parasitaria, es un platelminto hermafrodita que afecta al hombre (huésped definitivo) y desarrolla el parásito a nivel intestinal (teniasis), también afecta al cerdo y al humano (huésped intermediario) quienes desarrollan la fase larvaria o cisticerco en tejidos extraintestinales (cisticercosis, NCC). Es decir que el cerdo desarrolla sólo la fase larvaria o cisticercosis y el humano desarrolla la teniasis y la cisticercosis [14, 24].

El adulto de la *T.solium* es un parásito que vive en el intestino delgado de los humanos

parasitados. Es un gusano plano, segmentado y el adulto puede alcanzar hasta 7 a 8 metros de longitud. Morfológicamente está conformado por una cabeza o escólex, un cuello angosto y varios cientos de proglótides hermafroditos. El escólex mide menos que una cabeza de alfiler (2mm), presenta ganchos y ventosas con las que se fijan a la pared intestinal de donde absorbe los nutrientes que necesita. La parte reproductiva está conformada por proglótides inmaduros (con órganos genitales poco desarrollados), maduros (con ovarios y testículos desarrollados) y grávidos (con huevos infectivos, cada proglótide puede contener hasta 60000 huevos) [25].

Los huevos de *T.solium* son de forma esféricos, miden de 30 a 45 micrómetros, contaminan todo en su entorno y al ser ingeridos con los alimentos contaminados, el jugo gástrico disuelve la envoltura de los huevos en el intestino delgado, dejando libre los embriones y convirtiéndose en oncosfera, quienes atraviesan la mucosa intestinal hasta llegar al torrente sanguíneo, siendo transportados a diversos tejidos del organismo, donde se establecen y desarrollan el cisticerco o la fase larvaria (cisticercosis) [14, 18].

El huésped definitivo de la *T.solium* es el hombre (teniásico) y su entorno, son los más susceptibles de contaminarse y desarrollar la cisticercosis, sin embargo, la autoinfección no es frecuente [11, 18].

La teniasis, se produce por consumir carne de porcino infectada con larva o cisticerco y/o poco o mal cocida. Los huevos de tenia son excretados con las heces del portador humano o teniásico y pueden infectar a los cerdos (cisticercosis porcina) y al humano (cisticercosis humana). Las larvas se ubican y/o pueden infectar los tejidos subcutáneos, músculos, piel, ojos y cerebro, producir neurocisticercosis y es la forma más grave, en los pacientes puede producir diferentes cuadros clínicos como cefaleas, ceguera, convulsiones, epilepsia y en ocasiones puede ser mortal. La epilepsia es una manifestación prevenible, produce 30% de casos en zonas endémica [11, 18]. Su tratamiento y pronóstico no son buenos. Afecta la etapa productiva de la población (15 a 65 años), disminuyendo su capacidad laboral.

El estadio larvario o cisticerco produce la cisticercosis (el cerdo es hospedero intermediario natural, y el hombre es intermediario accidental), en *T. solium* (el cerdo es

hospedero intermediario normal, y el hombre es hospedero definitivo obligatorio).

Según la OMS (2018) [13], la cisticercosis afecta principalmente la salud y el sustento de las comunidades rurales de los países en desarrollo de África, Asia y América Latina, pudiendo causar efectos devastadores para la salud.

En los EE.UU la cisticercosis es considerada una infección desatendida, y está asociada a la pobreza, porque afecta a las personas de escasos recursos y sin acceso o con acceso limitado a la atención médica [14], por la migración.

Para el diagnóstico parasitológico se cuenta con técnicas coprológicas y observar huevos de *T. solium,* cuya morfología es indistinguible de los huevos de *Taenia saginata*; por esta razón en los últimos años se han perfeccionado técnicas con la ayuda de los anticuerpos monoclonales [26] y en la búsqueda de coproantígeno de *T. solium* con métodos adecuados para el diagnóstico.

Para el diagnóstico de la cisticercosis humana, principalmente neurocisticercosis, se cuenta con dos metodologías, los estudios por imágenes que son herramientas clínicas; sin embargo, los estudios inmunoserológicos de los casos permiten corroborar el diagnóstico y el estado vital del parásito [23]. El diagnóstico sugerido por el estudio de las imágenes debe considerarse al evaluar los resultados serológicos**.** El inmunodiagnóstico de la cisticercosis es complejo y está muy relacionado con el curso de la infección, la carga de la enfermedad, la ubicación del quiste y la respuesta inmune del huésped [27].

El diagnóstico de la neurocisticercosis humana se basa en las imágenes del cerebro para observar los quistes o cisticercos, así como las características de las lesiones y el examen de las pruebas inmunoserológicas altamente sensibles y específicas se utilizan para la confirmación etiológica [27, 28, 29].

El desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico (moleculares, genéticos y otros), actualmente es una de las prioridades importantes para las investigaciones de cisticercosis, ser capaz de diferenciar las infecciones con parásitos vivos de las

infecciones inactivas, y correlacionar la infección con la carga parasitaria, centrándose en el ensayo de inmunoelectrotransferencia (IB) transferida a enzimas de glucoproteína unidas a lectina de lentejas (LLGP-EITB) como la prueba de elección [30].

Las proteínas antigénicas del cisticerco o larva de *T. solium* son variadas, se ubican en la membrana o en líquido o fluido vesicular (antígenos de excreción/secreción), los que son reconocidos en las pruebas de inmunodiagnóstico, son glicoproteínas las cuales se expresan en la respuesta inmunológica [21].

Las fracciones proteicas del antígeno de fluido del cisticerco o larva de *T, solium* han mostrado mayor sensibilidad y especificidad que los antígenos totales [21, 23].
Las proteínas antigénicas de los líquidos intracorporales, se encuentran en mezclas proteicas, y, estas proteínas son de distintos pesos moleculares, el fluido vesicular del cisticerco de *T. solium* está compuesto por proteínas cuyos pesos moleculares oscilan entre 12 y 95 kilodaltons [21].

En 1989, se desarrolló la prueba EITB (también conocido como inmunoblot IB) utilizando la fracción LLGP y se convirtió en la prueba de elección para el serodiagnóstico. Las glicoproteínas LLGP-EITB del Ag.LVC. *T. solium* purificados por cromatografía acopla la especificidad y la capacidad resolutiva de la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) con la sensibilidad de la prueba inmunoenzimática. La purificación se realizó por cromatografía con lectina-lenteja, los resultados positivos se expresan en KDa, con 1 o más de las siete bandas específicas confirmatorias. Una prueba serológica positiva asociada con una imagen cerebral sugerente respalda el diagnóstico de neurocisticercosis [28, 29]. La glicoproteína LLGP-EITB o IB sigue siendo la prueba de elección para el diagnóstico clínico [30].

Epidemiología de la teniasis/cisticercosis

Si una persona consume alimentos contaminados con huevos de *Taenia solium*, da lugar a la cisticercosis y/o neurocisticercosis, enfermedad relacionada con la pobreza, con el pésimo sistema sanitario y educación para la salud. Se considera una zoonosis parasitaria que afecta el sistema nervioso central con cerca del 70 % de casos con crisis convulsiva o epilepsia de inicio tardío. La *T. solium* intestinal es importante para la población y para

su control es mejor el tratamiento del portador que mejorar el drenaje de los alcantarillados (aguas servidas). La cisticercosis es una zoonosis parasitaria de los países endémicos y se ha reportado casos en los países musulmanes donde no se consume carne de porcino [31].

La teniasis-cisticercosis es endémica en América latina donde la situación de salud pública es inadecuada y es considerada un riesgo sanitario porque sería la principal causa de epilepsia o convulsiones. La cisticercosis causa problemas de salud humana y de la manufactura cárnica porcina [32].

Según Ayala et al. (2014) [16], en Latinoamérica (México, Perú, Brasil, Guatemala, Honduras, Bolivia, Ecuador, Colombia, Venezuela) se han realizado varios trabajos de investigación en cisticercosis y con resultados variables.

La teniasis-cisticercosis se presenta en los países de África, a excepción de las áreas musulmanas, donde no se consume carne de cerdo por razones religiosas. La prevalencia en Asia es variada, ausente en Japón y Singapur, por sus altos estándares de vida, y en los países islámicos. Es endémica en India, China, Indonesia y Vietnam.

Según Fernández y Díaz (2003) [33], al respecto manifiestan que a inicio del siglo pasado la cisticercosis fue común en Europa, sin embargo, las mejoras en los sistemas de salud pública disminuyeron la prevalencia, la presencia de los casos de cisticercosis es por los inmigrantes provenientes de los países endémicos; también se han encontrado casos autóctonos en Portugal entre otros. Por otra parte, el aumento de la inmigración de las zonas endémicas ha aumentado la incidencia de esta enfermedad en los países desarrollados [32, 34].

Ciclo biológico o evolutivo de Taenia solium:

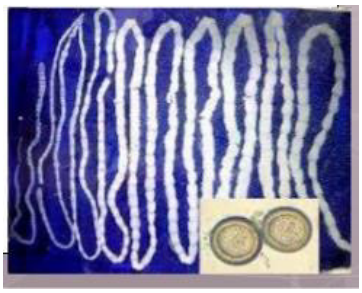
Según Flisser (2011) [35], el ciclo biológico de *Taenia solium* (helminto aplanado) comprende el adulto o teniasis que se desarrolla en el intestino humano y con las heces se eliminan los huevos y proglótides grávidos, los adultos tienen un promedio de 1000 proglótides (humano, huésped definitivo); el cerdo se parasita al ingerirlas, las oncosferas o hexacanto (larva ciliada, esférica, provista de tres pares de ganchos, se encuentra en la

envoltura embrionaria externa del huevo) eclosionan a nivel intestinal, ingresan al sistema circulatorio y se transforman en larvas o cisticercos (puede sobrevivir por varios años en el animal), ubicándose en el músculo esquelético y en el sistema nervioso central (cerdo, hospedero intermediario natural y el hombre, hospedero intermediario accidental). (Ver Fig. 1).



Cisticerco. Ayala E. [36]





Taenia solium. Rodríguez C [37]

Figura 1.- cisticerco (larva) y adulto (*Taenia solium*)

El hombre portador del cisticerco se infecta al ingerir carne infectada cruda o poco cocida, en el intestino el cisticerco se desarrolla durante 2 meses y se convierte en una tenia adulta, tiene una longitud de 2 a 7 mt. y se adhieren al intestino delgado por su escólex, y puede sobrevivir durante años. Unos cuatro meses después de la infección, la tenia adulta libera diariamente con las heces unas 6 proglótides grávidas y después liberar unos 50000 huevos por proglótide. Los huevos pueden sobrevivir de días a meses en el medio ambiente capaces de infectar a los humanos y a los cerdos causándoles cisticercosis o neurocisticercosis; la infección en las personas ocurre por ingerir alimentos contaminados con huevos de tenia [27, 35, 38] (Ver Fig. 2).

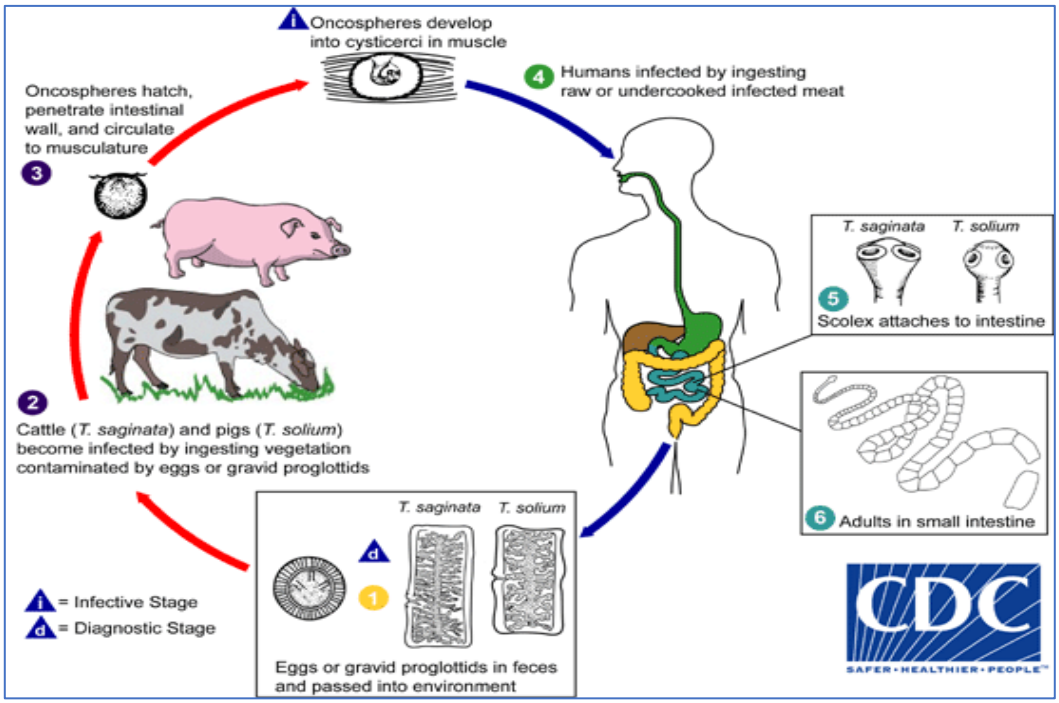
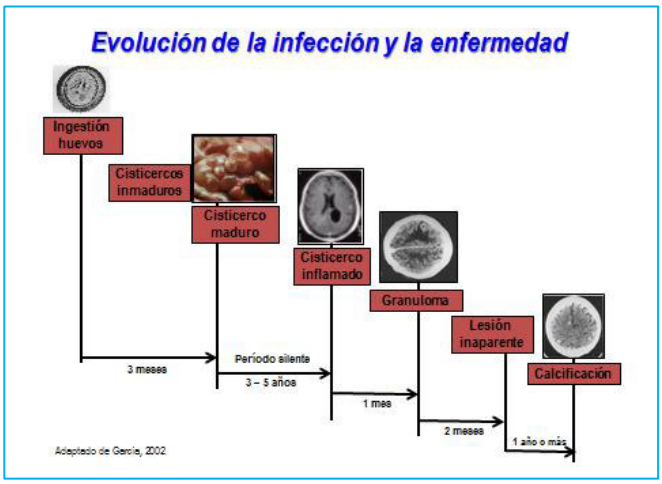


Figura 2.- Ciclo biológico, Centros para el Control y Prevención de Enfermedades-CDC.USA [38].

Huevos: El hombre parasitado con *T. solium* o la forma adulta elimina los huevos en las heces o en los proglótidos grávidos, los huevos contienen un embrión hexacanto, provisto de seis ganchos. Por la morfología, son difíciles de distinguirlos de *T. saginata*. Los huevos o proglótidos, por acción de los jugos digestivos a nivel intestinal del cerdo libera los embriones hexacantos, los cuales se adhieren a la mucosa con sus ganchos y penetran la pared intestinal para llegar a los vasos sanguíneos, a diversos órganos y tejidos, finalmente se localizan en la musculatura y cerebro para desarrollar la cisticercosis [39] (Ver Fig. 3).



Huevo de *Taenia-solium* [40]



Adaptado de García 2002 [15]

Figura 3.- Huevo de T.*solium* y evolución de la infección y la enfermedad [39]

Síntomas.

a- ***La teniasis***, puede causar problemas digestivos en los pacientes con manifestaciones leves e inespecíficos, como dolor abdominal, pérdida del apetito, pérdida de peso y malestar estomacal (náuseas), diarrea o estreñimiento, a las 8 semanas, la tenia o adulto completa su ciclo biológico o nivel del intestino delgado (yeyuno) OMS [13].

Los síntomas más visibles de teniasis son la eliminación de proglótides a través del ano y las heces (CDC-USA, 2013) [40].

b- En cisticercosis**,** los infectados pueden permanecer asintomáticos por años (periodo de incubación variable) o ser muy evidente. En algunas regiones endémicas como Asia el compromiso del sistema nervioso es casi nulo, hay preponderancia de casos de cisticercosis subcutáneo y la infección produce nódulos (pequeños bultos) o quistes.

Pueden causar efectos devastadores para la salud: cefaleas graves o crónica, ceguera, convulsiones, confusión, desconexión con la gente y el ambiente circundante, problemas de equilibrio, hidrocefalia y puede conducir a la muerte (OMS) [13]**.** También puede ser neurológica y/o psíquica, parálisis de pares craneales, hemiplejia, alteraciones visuales, etc. su pronóstico y tratamiento no son buenos por ser difícil su diagnóstico clínico.

Los signos y síntomas dependerán del lugar y número de cisticercos en el cuerpo del paciente:

Cisticercos en los músculos: Generalmente no causan síntomas. Hay protuberancias debajo de la piel.

Cisticercos en los ojos: No es común, ocasiona visión turbia o borrosa, hinchazón o desprendimiento de la retina.

Neurocisticercosis (en cerebro o médula espinal): Ocasiona a menudo lesiones en el cerebro y síntomas mencionados anteriormente (CDC- USA) [41].

Tratamiento:

El tratamiento por lo general es con medicamentos antiparasitarios y antiinflamatorios. A veces, se requiere cirugía para extraer los cisticercos de ciertos lugares, cuando los pacientes no reaccionan al tratamiento. No todos los casos de cisticercosis son tratados (CDC- USA) [41]

La neurocisticercosis se puede tratar con praziquantel y/o albendazol, entre otros. La dosificación es por el clínico, depende de los signos, síntomas que son diversos(OMS) [13].

Limitaciones:

Entre las limitaciones del estudio podemos señalar la recolección de material antigénico (LVC.*T. solium*), que implica conseguir cerdos vivos naturalmente parasitados con cisticercosis en las zonas endémicas, previamente seleccionados, y, además no fue posible acceder al Ag. purificado de cisticercosis del CDC de Atlanta-USA para ser utilizado como control y referencia, por lo que no fue posible realizar una comparación frente a nuestros antígenos semi purificados.

CAPÍTULO III
METODOLOGÍA

Tipo de Investigación: El estudio es observacional.

Consideraciones éticas: La obtención de muestras de suero humano en las zonas endémicas fue con protocolo y consentimiento informado (Ficha Clínica Epidemiológica) aprobado por el Comité de Ética-INS-MINSA. (Ver Anexo 1).

Diseño metodológico: No experimental (estandarización y validación).

Unidad de análisis: Fracciones antigénicas del líquido vesicular de cisticerco de *Taenia solium*

Población o Material de estudio: Larvas o cisticercos de *T. solium* obtenidos de cerdos parasitados naturalmente procedentes de zonas endémicas (Ayacucho-Huanta, Junín-Huancayo, Huánuco, Ucayali).

Muestras: Se obtuvieron 5 muestras de Fluido o Líquido Vesicular de Cisticerco de *T. solium,* de cerdos parasitados naturalmente, procedente de algunas zonas endémicas, (uno de Huanta (Ayacucho), dos de Huancayo (Junín), uno de Huánuco, uno de Ucayali. El estudio se realizó con las fracciones antigénicas del LVC.

Las 375 muestras de suero sanguíneo humano también fueron obtenidas en las zonas endémicas, para determinar la sensibilidad y especificidad del Ag.LVC. *T. solium* semi purificado.

Criterios de selección: La selección de los porcinos se realizó en el campo de las zonas o áreas del país consideradas endémicas de cisticercosis y escogidas por conveniencia (Huánuco, Huancayo, Huanta, Ucayali), mediante el examen de lengua y teniendo en cuenta la presencia de cisticercos bajo la lengua, sintomatología, aspecto clínico del porcino (pelaje erizado en la nuca, papada ensanchada y caderas reducidas entre otros).

El beneficio de los porcinos se realizó en el camal de cada zona, se descartaron la carcasa,

intestinos y estómago. La disección se realizó en los Laboratorios de Referencia Regional.

Las muestras de suero sanguíneo humano, previa firma del consentimiento informado, fueron obtenidas en las zonas endémicas de pacientes que acudieron a los establecimientos de salud. Los sueros control SCP, SCN fueron obtenidas de la seroteca del LZP-INS.

Variable: Fracciones proteicas antigénicas del fluido o líquido de la larva de *Taenia solium* (Ag.LVC).

Criterios de inclusión: Fracciones proteicas antigénicas de Líquido Vesicular de Cisticerco de *T. solium,* con 08 bandas de precipitación entre 13 y 35 KDa. más sensibles, específicas y de diagnóstico (Ver IB: Interpretación de resultados, y, Tab. 3, 4).

Las muestras de suero sanguíneo humano fueron utilizadas para determinar la sensibilidad y especificidad del Ag.LVC.*T.solium* semi purificado mediante las pruebas serológicas de ELISA (prueba de tamizaje) e Inmunoblot (IB, prueba confirmatoria).

Parte Experimental:

***Obtención del Líquido Vesicular de Cisticerco de T. solium* (LVC.*T. solium*).**

Las muestras biológicas (cisticerco y líquido o fluido de la larva de *T.solium*) se obtuvieron por disección de porcinos naturalmente parasitados, previamente seleccionados y procedentes de diversas zonas o áreas del país consideradas endémicas de cisticercosis (Huánuco, Huancayo, Huanta, Ucayali; total cinco lotes). Participación del personal de los Laboratorios de Referencia Regional (LRR) y del Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria del Centro Nacional de Salud Pública del Instituto Nacional de Salud (LRNZP-CNSP/INS-MINSA).

La búsqueda de cerdos parasitados con cisticercosis fue realizada en el campo (área rural). La identificación y selección de los cerdos se realizó mediante el examen de lengua, que consiste en visualizar o palpar los cisticercos en la superficie de la cara posterior de la lengua del cerdo. Este método es relativamente sensible (87%) y altamente específico (99%) para detectar cisticercosis porcina [10, 21, 36]. Los cerdos parasitados con cisticercosis

fueron sacrificados en el camal de cada zona y luego transportados al Laboratorio de Referencia Regional donde se procedió a la disección de la musculatura, del cerebro, el corazón y la lengua para que queden a la vista los cisticercos y poder obtener el LVC o material antigénico.

La disección o corte de la musculatura de los cerdos conservadas en hielo fue para obtener el líquido vesicular de los cisticercos por punción con jeringa de tuberculina estéril, se depositó en un tubo de centrífuga Falcon de 15 mL. (ver Fig. 4). Los tubos con muestras se conservaron con cubos de hielo (2 a 8ºC) y protegidos de la luz en una caja de poliestireno-tecnopor.

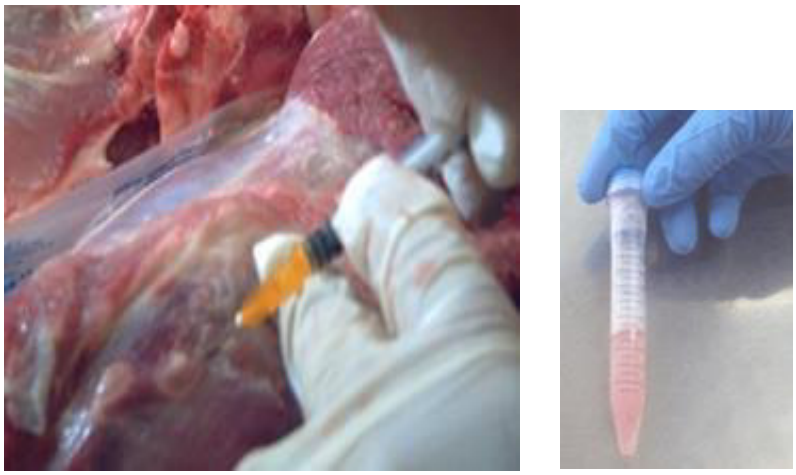


Fig.4.- Obtención del Líquido Vesicular de Cisticerco (LVC.*T.solium*)

Los tubos con LVC se centrifugaron a 9000 rpm. por 15 minutos, para separar vestigios de membranas, tejidos y restos celulares. El sedimento de descartó y al sobrenadante se le denominó antígeno nativo total o crudo, este fue extraído asépticamente en tubos rotulados, luego se sellaron, se congelaron y fueron enviados al Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria del Instituto Nacional de Salud (LRNZP-INS) [20].

En el LRNZP-INS los tubos con Ag-LVC.*T. solium* total fueron descongelados, y se agregaron inhibidores de proteasas, se ultracentrifugaron a 20114,9 g (centrífuga refrigerada Hitachi: Sorvall Discovery 100SE) por 1 hora a 4 ºC para eliminar componentes lipídicos y otros que puedan interferir en el proceso de semi purificación.
El LVC o sobrenadante fue extraído asépticamente (antígeno crudo o total - Ag.LVC.

T.solium t.) [10, 21]. El LVC.*T. solium* nativo total fue utilizado como material antigénico.

La cuantificación proteica de cada lote o antígeno se realizó mediante el método Lowry-1951 y se congelaron a -70 ºC o se liofilizaron para su uso posterior (ver Anexo 1, Fig. 5). Estos antígenos se utilizaron para la semi purificación de las proteínas antigénicas con sulfato de amonio.

Es importante tener en cuenta que desde el faenamiento del cerdo hasta la congelación del fluido vesicular no pasen más de 48 horas, el fluido debe mantenerse refrigerado, con inhibidores de proteasa y protegido de la luz, finalmente conservar el material biológico congelado a -70°C o -80ºC.

Preparación del Antígeno* LVC.*T. solium.

La metodología del trabajo en el Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria - Instituto Nacional de Salud (LRNZP-INS) basado en Tsang-CDC [21], Escalante [10], INS-Perú [42] es la siguiente:

Los tubos con antígeno total (Ag.LVC.t) fueron descongelados, y se agregaron inhibidores de proteasas: 3µL del stock PMSF 0.33M / mL.de Ag. para serina proteasa y 2µL del stock EDTA 0.5M / mL.de Ag. para metano proteasa, después se realizó la semi purificación y se determinaron las concentraciones proteicas por el método de Lowry.
No se realizó la cuantificación proteica antes de agregar los inhibidores de proteasa, porque los Laboratorios Regionales donde se recolectaron las muestras antigénicas (LVC.*T.solium*) no tenían el material respectivo.

Cada lote de los antígenos nativos totales (Huánuco, Ucayali, Huancayo y Huanta) fueron sometidos a proceso de semi purificación mediante concentración por precipitación proteica con sulfato de amonio $SO_4(NH_4)_2$ al 20% (se detalla más adelante).
Se dializaron y una alícuota del Ag.LVC. semi purificado se utilizó para determinar la concentración proteica por el método Lowry y los de mayor concentración, por encima de 0.7 µg./µL, fueron evaluados para separar las proteínas antigénicas por electroforesis en gel de poliacrilamida denaturante (SDS-PAGE), uno de los métodos más utilizados para purificación, visualizar, identificar el perfil proteico o caracterización proteica

(bandas proteicas específicas) según su peso molecular (García-2000 y Levine-2007), coloreadas con azul de Comassie, electro transferencia a la membrana de nitrocelulosa para obtener tiras reactivas para la prueba de Inmunoblot o EITB [43, 44] y determinar los componentes proteicos según su peso molecular al enfrentarlo con un control positivo y demostrar la presencia de las bandas reactivas específicas de diagnóstico de la cisticercosis. Además, el Ag.LVC.*T.solium* semi purificado sirvió para la prueba de ELISA y la prueba de IB [22].

Una parte del Ag.LVC semi purificado se distribuyó en alícuotas de 50, 100, 200 y 500 µL y se almacenaron a -80°C hasta el momento de ser utilizados, y otra parte, entre 15 a 20 mL, se trasvasaron a viales de 50 mL. para su liofilización.

Evaluación del Ag.: Para esta evaluación el Ag.LVC.*T.solium* semi purificado se impregnó en microplacas de poliestireno para realizar las pruebas inmuno enzimáticas de ELISA, NCM-ELISA y se prepararon tiras reactivas para la prueba Inmunoblot con antígeno total y semi purificado de Ag.LVC.*T.solium*, y, se enfrentaron a un pool de sueros positivos y negativos.

Se colectaron los cisticercos rotos para la preparación de láminas coloreadas – específicamente con escólices - como material didáctico.
Finalmente se depositaron los músculos y material trabajados en bolsas de plástico para su incineración.

Precipitación de proteínas con sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$ 20%-OMS mejorado
Se utilizó sulfato amónico 20%: Solución saturada de $(NH_4)_2S0_4$ en agua destilada, pH 7,2 (ver Anexo 2).

Uno de los métodos más utilizados para la concentración, purificación y fraccionamiento de proteínas, a gran escala o escala de laboratorio es la precipitación con sulfato de amonio, y se puede utilizar para separar proteínas al alterar su solubilidad en presencia de una alta concentración de sal. El sulfato de amonio es útil como precipitante porque es altamente soluble, estabiliza la estructura de la proteína, tiene una densidad relativamente baja y es relativamente económico [45].

Procedimiento:

Como primer paso, la muestra de LVC se libera de la mayor parte de sus contaminantes de escaso y elevado peso molecular, como son los detritus, fibras, tejidos, células, etc., a una temperatura baja (0-10°C) y centrifugación suave. Los métodos de precipitación y sedimentación son útiles para la concentración de pequeños volúmenes, y ofrecen la ventaja de que permiten separar la mayor parte de las proteínas no deseadas.

Luego de centrifugar, se recoge el filtrado (sobrenadante) y se registra el volumen total.
Se pone el LVC en hielo y se añade lentamente un volumen igual de solución fría saturada de sulfato amónico 20%, pH 7,2 y en agitación constante.
Se deja reposar a 4°C hasta el día siguiente. Se centrifuga el precipitado de proteínas durante 30 minutos a 800 g, a una temperatura de 4°C.
Se desecha el líquido sobrenadante.
Se re suspende de nuevo el sedimento o precipitado en agua destilada o en solución salina amortiguada con fosfatos (SAF) pH 7,4 y 0,01 M, hasta un volumen final igual al LVC original.
Se deja reposar durante 60 minutos como mínimo. Se centrifuga la suspensión durante 30 minutos a 45OO g a una temperatura de 4°C.
Se repiten las operaciones 1 a 4 veces hasta que el líquido sobrenadante quede claro (tres veces por lo menos).
El sedimento final se recoge en la mitad del volumen de LVC original.
El sulfato amónico se separa de las proteínas por diálisis o por filtración con Sephadex.
En este último caso, por cada 10 ml de solución de proteínas se usará una columna de gel de Sephadex de 200 mmx 15 mm, equilibrada con SAF 0,01 M. Se recoge la fracción opalescente cuando aparezca.
Se toma nota del volumen y se determinan la concentración de proteínas totales con la reacción de Biuret u otro método (Lowry).

Liofilización del antígeno semi purificado

El sobrenadante o Ag.LVC semi purificados se alícuotaron en frascos de tamaño adecuado, la tercera parte del frasco o vial de 50 cc. tipo penicilina, la congelación del fluido en las paredes del vial se consiguió rotando el frasco en un baño refrigerante de hielo seco y alcohol o colocando el vial, con el fluido dentro, en pico de flauta a - 80°C.

Luego se procedió a liofilizar teniendo cuidado que la temperatura externa del vial no exceda de - 40°C (ver Anexo 1, Fig. 5).

El fluido vesicular liofilizado o el Ag.LVC.*T.solium* semi purificado se almacenó en frascos perfectamente sellados, en lugar fresco y seco hasta el momento de su empleo.

Cuantificación del Ag.LVC.T.solium semi purificado

En nuestro país no tenemos estudios respecto a la cuantificación o concentración proteica del LVC.*T.solium*, por ello se realizó la cuantificación de este material biológico, mediante el método Lowry-1951, en el laboratorio referencial del Instituto Nacional de Salud para la curva estándar (ver Anexo 2, Gráfico 1) y el Ag.LVC. *T.solium* semi purificado de cerdos parasitados naturalmente procedentes de las zonas endémicas como Huánuco, Ucayali, Ayacucho-Huanta y Junín-Huancayo. En el porcino de Huancayo-Músculo, se obtuvo una concentración proteica [pt] de 3.6 µg./µL (ver Tabla 1). También se determinó el punto de corte o cut off para la prueba ELISA (ver Anexo 2: Lowry, y, Cuadro 1, 2, 3)

Con este material se preparó el antígeno crudo o total, y, las proteínas antigénicas del LVC.*T.solium* semipurificadas por precipitación con sulfato de amonio, permitió separar las fracciones antigénicas del fluido vesicular de cisticerco de *T.solium.* Finalmente, el antígeno semi purificado se liofilizó para conservarlo hasta su uso.

Ag.LVC. *T.solium* semi purificado para ELISA e IB

Protocolo:

Según Tsang-CDC [21], Escalante [10], INS-Perú [42]; Ayala-Sulca E, Miranda-Ulloa E.[20], se procedió de la siguiente manera:

Se descongeló (-70 ó -80°C) el Ag.LVC. *T.solium*-semi purificado y/o se hidrató el LVC liofilizado con una solución Tris/HCl 0.05, pH8.0.

Con este material o Ag.LVC semi purificado se preparó la concentración proteica adecuada para las pruebas inmunoserológicas (ELISA, IB) y se realizó una corrida electroforética en gel denaturante de poliacrilamida SDS-PAGE, para identificar las bandas proteicas (perfil proteico), transferirlas a la membrana de nitrocelulosa para

preparar las tiras reactivas y ser utilizadas en las pruebas moleculares (Inmunoblot). La prueba de ELISA, se utilizó como procedimiento de tamizaje. La prueba de Inmunoblot, se utilizó como procedimiento confirmatorio.

Las tiras reactivas impregnadas con Ag.LVC. *T. solium* semi purificado, se enfrentaron a sueros de pacientes con *Cisticercosis, Equinococosis, Fascioliasis y teniasis* por *Hymenolepis nana*. Las bandas de precipitación cuyos pesos moleculares van de 35 a 13 KDa. (35, 31, 24, 23, 18, 17, 14 y 13) no cruzan con ninguna de las bandas proteicas de las parasitosis anteriormente mencionadas, y son los pesos moleculares o bandas proteicas de diagnóstico que nos interesan aislar.

La sensibilidad y la especificidad se determina mediante las pruebas de ELISA e Inmunoblot de las fracciones antigénicas frente a un pool de sueros positivos a cisticercosis comprobados parasitológicamente y/o por cirugía (Gold standar) y frente a sueros negativos de pacientes en quienes no se han demostrado cisticercosis en ninguna de sus formas. La prueba de oro es la demostración de las proglótides de la tenia o de los huevos de *T. solium* mediante estudios coprológicos.

Control de calidad

Según Tsang-CDC [21], Escalante [10] y las Normas de Calidad del INS-Perú [42], el Ag.LVC. *T. solium* semi purificado se obtuvo según el procedimiento indicado. Las proteínas fueron separadas y transferidas electroforéticamente y fueron controladas mediante la prueba Inmuno blot para buscar la presencia de unas ocho bandas proteicas de precipitación entre 35 a 13 KDa. en la membrana de nitrocelulosa, se comparó los resultados del antígeno semi purificado y el antígeno de referencia frente a un pool de sueros control positivo y control negativo.

Selección del Panel de Sueros de Referencia (SCP, SCN)

Las muestras de suero sanguíneo humano que sirvieron como controles (positivos y negativos) fueron seleccionadas de la seroteca del LRNZP-INS. Estas muestras, 100 en total, se seleccionaron por conveniencia y se distribuyeron según se muestra en la Tabla 2. Las características son las siguientes:

Cincuenta (50) sueros positivos a cisticercosis: procedieron de pacientes con cisticercosis confirmada por dos pruebas de imágenes (resonancia magnética o RM y tomografía axial computarizada o TAC), también fueron confirmadas por serología (prueba EITB o IB con Ag.LVC.*T.solium* nativo total).

Cincuenta (50) sueros negativos a cisticercosis: 20 sueros procedieron de personas sanas (confirmadas con RM, TAC y serología EITB negativos a neurocisticercosis) y 30 de pacientes sin cisticercosis y/o con otras parasitosis (H*idatidosis* 10, Fasciolosis 5, *Chagas* 5, *Toxoplasmosis* 5 y *Leishmaniosis* 5). Todos estos sueros (controles negativos) fueron de personas procedentes de zonas no endémicas a cisticercosis (ver Tabla 4).

Finalmente, se evaluó la presencia de las bandas de precipitación diagnósticas específicas de interés del antígeno semi purificado y se compararon con las bandas del antígeno total o Ag.LVC.*T.solium* nativo semi purificado y total.

Muestras de suero sanguíneo humano para evaluación:

Las 375 muestras de suero sanguíneo fueron obtenidas por punción venosa de los pacientes -previo consentimiento informado- que acudieron a los centros de salud en algunas zonas endémicas, en tubos Vacutainer etiquetadas, aproximadamente 10 mL, se dejó reposar para obtener el suero sanguíneo en crio viales etiquetados (1-2mL), fueron congelados y transportados al LZP-INS

Procesamiento de datos:

Se realizó mediante estadística descriptiva de los datos cuantitativos y cualitativos.
El análisis de la Sensibilidad y Especificidad fue mediante la tabla de contingencia 2 x 2 con el paquete estadístico IBM-SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

Se determinaron la sensibilidad y la especificidad, así como los valores predictivos positivos y negativos, mediante pruebas de ELISA e Inmunoblot de las fracciones antigénicas del Líquido Vesicular de cisticerco con el antígeno total o crudo y el antígeno semi purificado, frente a un pool de sueros positivos de pacientes con cisticercosis comprobados parasitológicamente y frente a sueros negativos de pacientes en los cuales no se han demostrado cisticercosis.

Métodos inmunoserológicos para el diagnóstico de la cisticercosis humana

Las pruebas inmunoserológicas: Hemaglutinación indirecta, ELISA, Aglutinación de partículas de Látex, Inmunoelectroforesis, Inmunoblot (IB); son útiles para establecer con mayor precisión las tasas de prevalencia de la cisticercosis y el estado vital del parásito [11, 15, 18]. Las técnicas serológicas más usadas en la actualidad incluyen ELISA e IB [22, 20].

La prueba de ELISA se utiliza como procedimiento de tamizaje, a pesar de su alta sensibilidad tiene baja especificidad, pues capta falsos positivos por las reacciones cruzadas que presenta con *equinococosis, teniasis por Hymenolepis nana, fascioliasis y esquistosomiasis* [22], cuando se usa extracto total.

La prueba de Inmunoblot es utilizado por su alta sensibilidad (91-98%) y alta especificidad (100%) para la detección de anticuerpos de tipo IgG en suero de pacientes con cisticercosis [19, 20] cuando se trabaja con antígeno purificado.

I.- Técnica de ELISA para el diagnóstico serológico de cisticercosis:

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas) es una técnica de ensayo inmunoenzimático en la cual el antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo adherido a una enzima y generar un producto colorimétrico (densidad óptica) [40]**.** Se empleó el método ELISA indirecto para detectar anticuerpos en el suero (ver Anexo 3, Figs. 6-A, 7 y 8) y Fig. 6-B, Fig. 6-C.

Se impregnaron microplacas de poliestireno con el Ag.LVC.*T.solium* total y el semi purificado. Se evaluaron y se validaron los antígenos para la prueba de tamizaje ELISA Y NCM-ELISA. Se determinó la eficiencia diagnóstica (sensibilidad y especificidad).

Fundamento.

Según el INS-Perú [42] modificado y Hancock, K [45], consiste en la demostración del anticuerpo presente en el suero del infectado (anticuerpo primario), al ser ligado a un anti-anticuerpo específico (anticuerpo secundario), el cual se encuentra marcado con una enzima. La adición del sustrato correspondiente da lugar a un producto coloreado. El color es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en el suero y puede ser medido en un espectrofotómetro (lector de ELISA) o hacer la lectura visualmente. El método emplea como soporte del antígeno la superficie de los pozos de una placa de

microtitulación.

Procedimiento.

Se adhirió 100 µL.del Ag.LVC.*T.solium* semi purificado (1/1000), diluido en sol. Tris - HCl 0.01M pH 7.5 (ver Anexo 3) a una conc. proteica de 1µg/mL a los pocillos de la placa de micro titulación (fondo plano Corning o Falcon) para la prueba de ELISA.

Se cubrió la placa con su tapa, Parafilm u hoja plástica para evitar la contaminación y evaporación, se incubó en estufa a 37°C x 2 Horas y se refrigeró hasta el día siguiente.

Se dejó atemperar la placa y se lavó los pocillos de la placa con solución buffer o amortiguadora o sol. de lavado PBS-$Tween_{20}$ o PBS-T (ver Anexo 3) para remover el exceso de Ag.: Se colocó 200 µL del buffer de lavado en cada pocillo por cinco veces, y se eliminó el contenido invirtiendo rápidamente la placa cada vez, después de lo cual se llevó la placa sobre papel absorbente, dando golpes suaves, hasta dejarla sin restos del buffer o utilizando el lavador de ELISA.

Se adicionó 100 µL por pozo de solución (sol.) bloqueadora (Anexo 3), se cubrió la placa con su tapa y se incubó en estufa a 37°C por 30 mins.
Se lavó los pocillos al igual que en el paso anterior (lavar el exceso de Ag.).

Siguiendo un esquema de distribución de los sueros por duplicado en la placa de ELISA, se añadió a los pocillos 100 µL de la dilución (dil.) en solución buffer o amortiguadora (PBS-T-L) del Suero por evaluar o suero problema (SP) a partir de una dil. 1/500, además los sueros controles: Negativo (SCN), Positivo (SCP) y el Blanco (B).

Luego se cubrió la placa. Se incubó la placa a 37°C por 1 hora.
Se eliminó el contenido de los pocillos, en un recipiente con lejía al 5%.
Se lavó nuevamente los pocillos, igual que en el paso anterior (lavar el exceso de Ag.).
Se añadió a cada pocillo 100 µL de la inmunoglobulina Anti-IgG Humano-Peroxidasa (conjugado), a una dil. 1/5000 en una solución PBS-TL. La dilución a utilizar lo determina cada laboratorio.
Se tapó la placa luego se incubó a 37°C durante1 hora.

Se eliminó el contenido y se lavó los pocillos de la placa como en el paso anterior (lavar el exceso de Ag.).
Se agregó 100 µL por pozo del sustrato cromógeno OPD (ver Anexo 3).
Se incubó en oscuridad (se cubrió la placa con papel carbón o aluminio): OPD tableta a temperatura ambiente (T°A.) por 5 mins. o OPD-polvo a 37°C por 30 mins. hasta observar coloración amarilla o variantes en los SCP.
Se detuvo la reacción con 25 µL de ácido sulfúrico 2M (OPD polvo) y 3M (OPD tab.), (ver Anexo 3).

Lectura.
Se realizó en el lector de ELISA, se anotó el título de corte o Cut Off (título de corte: 0.125). La Densidad Óptica (DO) o Absorbancia, igual o por encima del título de corte (TC) se consideró Positivo y por debajo del mismo se consideró Negativo. Si no hubiera lector, la lectura será a simple vista, la presencia de coloración amarilla o variantes en el control positivo se comparó con las diluciones de los sueros problema, esta lectura es muy subjetiva.

La lectura se realizó a una longitud de onda 490 nm. (absorbancia) y un filtro de referencia de 620 nm - 630nm.

Para el reporte de los resultados, se tuvo en cuenta el Título de Corte o Cut Off, la Densidad Óptica (DO o absorbancia) y la dilución de la muestra.

Una prueba de ELISA Positivo a diluciones bajas no necesariamente corresponde a cisticercosis porque puede cruzar con otras teniasis.

Ensayos de Inmunoabsorción ligado a Enzimas en Membranas de Nitrocelulosa (NCM-ELISA)
Se estandarizó la prueba de ELISA en membrana de nitrocelulosa, el cual nos permitió medir de forma cualitativa la actividad específica de las fracciones antigénicas que se sometieron a este ensayo y se obtuvo positividad en todas, estas fueron ensayadas contra inmunoglobulina G de sueros humanos positivos, teniendo como resultado un reconocimiento más notable de las fracciones por parte del anticuerpo y del antígeno

crudo, sin embargo las fracciones semi purificadas también presentaron positividad baja debido a la poca cantidad de proteína que contienen. En la Fig. 8 (Anexo 3) se muestran las manchas en la membrana las cuales nos indican positividad.

Protocolo adaptado-INS-Perú [42], Tsang (CDC) [21], Escalante [10], Ayala-Sulca [20]

Se trazó una plantilla en la membrana de nitrocelulosa y se humedeció con solución PBS durante 5 minutos. Se retiró y colocó el antígeno en la membrana (20-30 µl), se reposó por 10 minutos. Se bloqueó con una solución PBS-TL, con 5% leche descremada (Sol.de bloqueo. Ver Anexo 3) durante 15 minutos en agitación constante a temperatura ambiente (T°A). Se colocó el suero problema 1:200 se incubó durante 1 hora en agitación constante.

Se colocó anti - IgG humana marcada con Peroxidasa 1:100 y se incubó durante 1 hora en agitación constante a T°A. Se reveló con una solución o cromógeno de 5 mg de 3,3´diaminobenzidina (DAB), más 10 µL de H_2O_2 (30%) por cada 10 mL de PBS durante 30 minutos en oscuridad. Finalmente, se lavó la membrana con agua destilada y se dejó secar.

Entre cada paso se lavó tres veces con PBS-T_{20} en agitación constante.

II.- Técnica de Inmunoblot (IB) para el diagnóstico serológico de cisticercosis:

Inmunoblot (IB) o electro inmuno transferencia (EITB), Westernblotting o Immunoblotting, es una técnica para detectar una proteína específica empleando anticuerpos [40].

Se realizó teniendo en cuenta 3 pasos o etapas, según los métodos del INS-Perú [42] modificado, Escalante [10], Tsang VC [21] y Ferrer E. [46] y consiste en:

Preparación de las tiras reactivas con Ag.LVC. *T. solium* total y semi purificado.
Preparación de la electroforesis y corrida electroforética.
Electrotransferencia de las proteínas antigénicas del gel SDS-PAGE a una matriz o membrana adsorbente de nitrocelulosa.
Evaluación y validación del antígeno para diagnóstico de cisticercosis humana *(*Ag.LVC. *T. solium* total y semi purificado) o tiras reactivas en el LRNZP- CNSP/INS.
Determinar la eficiencia diagnóstica (sensibilidad y especificidad).

Fundamento

Según Tsang-CDC [21], Escalante [10], INS-Perú [42] modificado, Ayala-Sulca [20], INS-Colombia [47], la técnica de IB demuestra la reacción de los anticuerpos del suero del paciente con las proteínas complejas del antígeno del cisticerco. Estas proteínas antigénicas son separadas electroforéticamente y luego transferidas a una matriz o membrana adsorbente. Esta matriz se incuba con los anticuerpos del paciente, a continuación, se incuba con una inmunoglobulina (conjugado) adherido a una enzima y finalmente con un substrato cromógeno. Si el suero del paciente tiene anticuerpos se observará en la membrana de nitrocelulosa un precipitado o producto insoluble en forma de bandas coloreadas que son específicas del parásito en estudio (*T. solium*). Ver Anexo 3: Fig. 9, 10, 11, 12 y 13. Presentamos el procedimiento en tres etapas:

Procedimiento: (Ver Anexo 3, Figs. 9, 10, 11, 12 y 13)

Primera etapa

Proteínas antigénicas separadas electroforéticamente en gel de poliacrilamida SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida es uno de los métodos más utilizados para purificación, análisis y caracterización de proteínas.

Las proteínas antigénicas fueron separadas electroforéticamente en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) según la técnica descrita por Tsang [21] y el INS-Perú [42], utilizando geles de separación y empaquetamiento (Gel BIO-RAD). Esta etapa se inició con la preparación de los geles inferior y superior (ver Tab. 2; Anexo 3, Fig. 9 y Tab. 5).

Gel de separación o de resolución (gel inferior 15%)

Se utilizaron 2 placas de vidrio para electroforesis (73mm.de alto x 102mm.de ancho) con espaciador de 0.75mm. o 1mm. de espesor. Se limpiaron con alcohol y se secaron. Se ensambló el material p/electroforesis utilizando los respectivos espaciadores. Se encajaron las placas en un soporte y se comprobaron con agua tridestilada (tridest.) que estén bien selladas. Se mezclaron los insumos para obtener el gel inferior deseado (ver Tab. 2). Con una micropipeta se depositó de inmediato el preparado hasta 65 mm de altura y se agregó agua tridestilada, para alinear el gel al momento de polimerizar o gelificar a T°A durante

unos 30 minutos.

Gel de empaquetamiento o de apilamiento (gel superior, 5%)

Se descartó el líquido del gel inferior, invirtiendo el soporte. Se preparó el gel a la concentración deseada 5% (gel superior, ver Anexo 3). Con una micropipeta se depositó de inmediato el gel de empaquetamiento o gel superior cubriendo el gel inferior. Se colocó el peine separador para especímenes de 0.75mm. de espesor, entre el peine y el gel de separación se dejó un espacio de unos milímetros. Finalmente, el preparado se dejó polimerizar a T°A. x unos 30 minutos.

Antígeno (Ag): El Antígeno es el Líquido o Fluido Vesicular de Cisticerco de *Taenia solium* semi purificado (Ag.LVC.*T.solium*-semi purificado) y liofilizado. Se resuspendió con solución de preparación de antígeno (ver Anexo 3). Se centrifugó a 10,000 rpm en centrífuga refrigerada por 30 minutos, y se determinó la concentración de proteínas del sobrenadante por el método Lowry (concentración final = 3.64 µg./µL.) y se conservó a –80°C hasta el momento de su uso.

Tratamiento de la muestra (Ag.LVC)

El Ag.LVC.*T.solium*-semi purificado se diluyó ¼ con una solución de Tratamiento de Muestra (Mo.) o de Antígeno (ver Anexo 3). Luego el Ag. tratado se colocó en baño María a 100°C por 5 minutos.

Preparación de la electroforesis

Se removió el separador del gel superior y con una solución o tampón de corrida (ver Anexo 3) se enjuagó las cavidades. Se agregó aproximadamente 200 mL de la misma solución en el recipiente superior y unos 300 mL en el recipiente inferior de la misma solución. Se aplicaron en las cavidades del gel de empaquetamiento 1, 2, 3, 4, 5 y 6 µL. del Ag.LVC-semi purificado de *T. solium* tratado. Se agregó en las cavidades del extremo derecho del gel 4 µL. de proteína estándar de bajo peso molecular (PM.LR) y 2.5 µL. de proteína tratada (pre teñida. Bethesda Research Laboratories), para iniciar la corrida Electroforética (ver Anexo 3, Fig.10).

Corrida electroforética

Se colocó la tapa de la cubeta y se conectaron los terminales eléctricos a una fuente poder de 120 Voltios (k). La pre corrida de la electroforesis se efectuó a 80V x 10 mins. (gel de empacamiento) y luego la corrida se pasó a 160V x 75 mins. (gel de resolución) para los dos geles hasta que el colorante trazador o marcador de corrida pase el borde opuesto de la placa de vidrio (ver Anexo 3, Fig.11). Finalmente se desconectó el sistema. Como resultado de la corrida electroforética se tuvo el perfil proteico y se escogió el de mejor visibilidad y resulta que el más adecuado para la transferencia es la conc. protéica 4µL= 14,56 µg./0.5cm (Ver Anexo 3, Fig.12, Fig. 13).

Segunda etapa

Transferencia:

Se transfirió las proteínas antigénicas del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa con poros de 0.22pm (Schleicher & Schuell) por electroforesis, empleando un recipiente de electroforesis o cámara de transferencia (BIO-RAD).

Preparación de la electroforesis para transferencia

Se preparó los geles: Gel de separación o de resolución (gel inferior 15%) y gel de empaquetamiento o de aplicamiento (Gel superior, 5%) en vaso de precipitado de 50cc. cada gel. Se colocó el peine para transferencia y se dejó polimerizar a T°A. por unos 30 minutos. Luego se retiró el peine y se adicionó tampón de corrida en el recipiente superior y en el recipiente inferior de la cubeta (ver Anexo 3, Fig. 13).

En la cavidad del gel de empaquetamiento se colocó 53 µL. de Ag.LVC.*T. solium* tratado (4 x 6.6 / 0.5 = 52.8 o 53µL. = 192.92 µg. Prot.). Se depositó 4 µL.de proteína de bajo PM. estándar (LR) en las cavidades del extremo derecho del gel y 2.5 µL. proteína tratada (pre teñida, Bethesda Research Labs.).

Corrida electroforética

Se colocó la tapa de la cubeta y se conectaron los terminales eléctricos a una fuente de poder de 120 Voltios (k). La pre corrida de la electroforesis se efectuó a 80V x 10 mins. (gel de empacamiento) y luego la corrida se pasó a 160V x 75 mins. (gel de resolución) para los dos geles hasta que el colorante trazador pase el borde opuesto de la placa de vidrio. Concluida la corrida electroforética se desconectó el sistema.

Preparación de la transferencia

En un recipiente con buffer de transferencia se colocaron la membrana de nitrocelulosa y sobre ella el gel. Ambos (membrana y gel) se depositaron en medio de papel filtro. Juntos se acomodaron en medio de esponjas, las que se colocaron a su vez en una pieza plástica o dos láminas de plástico con perforaciones en ambos lados (sándwich).

Enseguida este sándwich, se encajó en una cámara de transferencia y, finalmente se colocaron en una cubeta con hielo. Se verificó que el gel esté al polo negativo y la membrana adsorbente esté al polo positivo.

Electrotransferencia

Se colocó la tapa de la cubeta y se conectaron los terminales eléctricos a una fuente de poder de 120 volts. (K). La electrotransferencia se realizó a voltaje constante de 55 volts (K) con buffer de Transferencia Tris-HCl pH 9.8 por una hora a 4°C (refrigerado con pack de hielo). Al terminar la electrotransferencia, se retiró el gel y la membrana adsorbente se lavó 4 veces con sol.PBS.$Tween_{20}$ (ver Anexo 3) y una lavada más con sol. PBS sin $Tween_{20}$ en agitación constante. Enseguida se bloqueó la zona no saturada por los antígenos con PBS-$Tween_{20}$-Leche 5% por una hora en agitación constante y finalmente se realizó una lavada solamente con solución PBS. La membrana con el estándar más una porción del Ag.LVC semipurificado transferido se cortó y coloreó con solución 0.1% de tinta China.

Finalmente, la membrana que contiene el Ag.LVC, se cortó 3mm. de ancho o tiras reactivas, obteniéndose 22-24 tiras por cada membrana transferida [47] y se guardaron a - 20°C con papel filtro humedecidos en PBS sin Tween hasta el momento de utilizarlo.

Tercera etapa:

Reacción inmuno enzimática o Prueba EITB (inmunoblot o IB, westernblot)

Para la prueba IB se utilizó las canaletas o compartimentos de la bandeja de incubación o placa de plástico. En los compartimentos de la bandeja de incubación o placa para blot se distribuyó las tiras reactivas conteniendo Ag.LVC-semi purificado.

Se incubó las tiras con sol.PBS-T_{20} conteniendo 1 ó 5% de leche descremada o PBS-TL (Bloqueador, Anexo 3) a T°A x 30 mins. en un agitador mecánico a velocidad lenta. Se diluyó el Suero Problema, SCP, SCN, 1/100 en solución PBS-TL. Se incubó por 1 hora a T°A. y en agitación. Se realizó 3 lavadas de 7 mins. por vez, en sol. bufferT_{20} (PBS-T) a T°A. en agitación. Se agregó 1mL.de Conjugado marcado con una enzima (peroxidasa) a una dil. 1/1000 en solución PBS-TL. Se incubó 1 hora a T°A. en agitación.

Se lavó las tiras 2 veces x 7mins.c/vez con sol. PBS-T_{20} y una vez más con sol. PBS sin Tween. Se reveló la reacción de las tiras agregando la solución sustrato Diaminobencidina (DAB) más H_20_2.30% y se incubó en oscuridad y en agitación por unos 15 minutos (Anexo 3). Se preparó la solución con mascarilla y guantes.

Se visualizó las bandas en las tiras reactivas y se detuvo la reacción, lavándolas con agua desionizada varias veces. Se secó las tiras a T°A en campo oscuro.

Lectura

Se anotó los Pesos Moleculares de las bandas visualizadas. El diagnóstico de cada parasitismo se relaciona a la presencia de bandas específicas determinadas que varían en cada caso. Pacientes con cisticercosis, equinococosis, fascioliasis, esquistosomiasis y teniasis por *H.nana*, mostraron reactividad cruzada con las bandas de peso molecular 42 y 39 KDa. En cisticercosis las bandas reactivas que interesan varían entre 35 a 13 KDa. (35, 31, 24, 23, 18, 17, 14 y 13 KDa.). ver Fig.9.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

La cuantificación proteica del Ag.LVC.*T.solium* semi purificado (Tabla 1), indica niveles bajos y altos en los diferentes lotes de fluido vesicular o Ag. LVC. *T.solium* semi purificado, y con grandes variaciones entre las zonas endémicas de Perú.

Tabla Nº 1: Cuantificación o concentración proteica del Ag.LVC *T. solium* [36]

CONCENTRACIÓN PROTEICA ANTIGÉNICA LVC.*T.solium*		Promedio r1 a r4 [pt] µg/µL
Procedencia		Total
HCO	Huánuco	0,937
UCAY	Ucayali	0,806
HCYO.L	Huancayo (lengua)	0,520
HCYO.M	Huancayo (músculo)	3,596
AYAC	Ayacucho-Huanta	0,782

La curva estándar con un factor de calibración R de 0.9899 indica la linealidad de la curva, y la ecuación de regresión es**:** DO o Absorbancia = 0,0021 ($\bar{X}$ µg. pt) + 0,0793 (Ver Anexo 2: Gráfico 1).

Determinación del error estándar (Ag.LVC. HCYO.M):

Error Estándar = $\frac{\text{Desviación.Estándar}}{\sqrt{n}}$

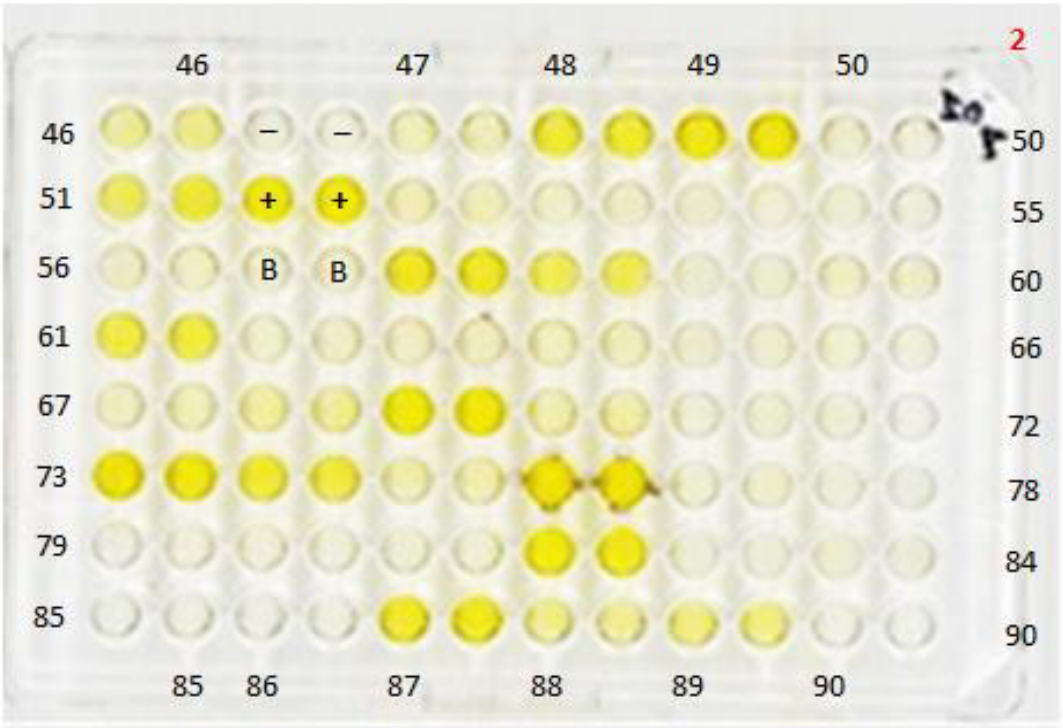
n = 3 (número de muestras examinadas)

Error Estándar = $\frac{0.01184624}{\sqrt{3}}$ ⟶ Error Est.= 0,006839428 ~ 0,68%

Datos obtenidos con las técnicas de ELISA e IB

De 375 muestras de suero humano procesados (con consentimiento informado y procedente de las zonas endémicas), 66 (17,6%) resultaron ELISA positivos, siendo el título bajo 1/500 y el título alto 1/64000. De los sueros ELISA positivos, 14/66 (21,2%) fueron confirmados por IB como positivos y corresponden a ELISA cuyo título es 1/1000.

A continuación se muestra una lectura visual de la placa ELISA (Figura 6-B) y: una NCM-ELISA, donde las manchas en la membrana indican Positividad (Figura 6-C).



.

Figura 6-B: Lectura visual de placa ELISA

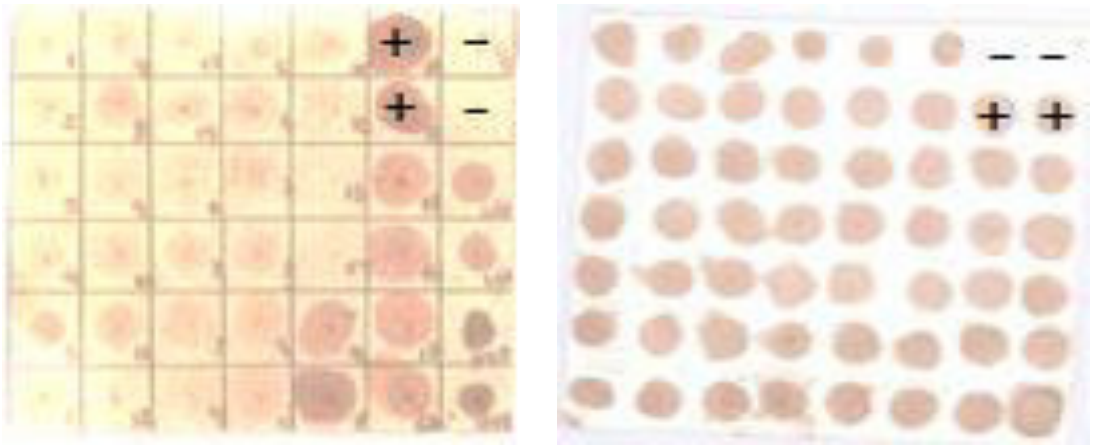


Figura 6-C: NCM-ELISA, Las manchas en la membrana indican positividad (Lectura visual)

Sensibilidad y Especificidad del Ag. LVC.T. solium semi purificado mediante las pruebas de ELISA e IB

El suero de los pacientes con sospecha de cisticercosis demostró, con la prueba de ELISA, alta sensibilidad (100%) y baja especificidad (85,6%), a la dilución 1/1000. Con la prueba de Inmunoblot (IB) se determinó una sensibilidad (93,5%) y una especificidad (100%) (Ver Tabla 2 y 3).

Tabla Nº 2: Cisticercosis con técnicas de ELISA e IB

CISTICERCOSIS	ELISA	%	IB	%
(+)	66	17,6	14	21,2
(-)	309	82,4	52	78,8
TOTAL	**375**	**100**	**66**	**100**

Tabla Nº 3: Sensibilidad y Especificidad de las técnicas ELISA e IB utilizandoAg. LVC. *T. solium* semi purificado.

Técnica	Antígeno Semi purificado	Sensibilidad (S) *	Especificidad (E) *
(ELISA) Ensayo inmunoenzimático	Líquido vesicular de cisticerco (LVC)	100%	85,60%
(IB) Inmunoblot	Líquido vesicular de cisticerco (LVC)	93,50%	100%

* Según el CDC el Ag. total tiene S=91% y E=100% y el Ag. purificado, S=94-100% y E=100%.
Nota: Para el valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), y la eficiencia diagnóstica de las referidas técnicas ver Anexo 4, Tabla 6, Tabla 7.

La sensibilidad y la especificidad del antígeno se determinó mediante las pruebas de ELISA e Inmunoblot frente a un pool de sueros positivos a cisticercosis comprobados parasitológicamente y por cirugía, y frente a sueros negativos de pacientes donde no se han demostrado cisticercosis en ninguna de sus formas.

Una prueba se consideró ELISA positivo, cuando la DO a 490nm. de la dilución de cada muestra de suero fue mayor que el punto de corte o cut off (PC); donde
PC =$\overline{X}$ + 3 Desv.est. = 0,125 (PC o Cut off según OMS-OPS. (Ver Anexo 2-ELISA).

***Cut off (Punto de Corte)* = PC**= $\bar{X}$ + 3 Desviación estándar

$$\text{Desv est.} = \sqrt{\frac{\sum X^2 - (\sum X)^2 / n}{n-1}}$$

Donde: Desv. Est. = Desviación estándar.
$\bar{X}$ = promedio de las lecturas de D.O o Absorbancia
n = número de muestras examinadas

El procesamiento de la información se realizó mediante estadística descriptiva de los datos cuantitativos y cualitativos, además tabla de contingencia 2x2 con paquete estadístico IBM SPSS.

Interpretación de resultados

Reacción positiva: Si DO es mayor que el punto de corte (Cut off). La presencia de coloración amarillo pajizo a anaranjado ladrillo nos indica reacción positiva, siempre que ella sea más intensa que el suero control negativo.

Reacción negativa: Si DO es menor que el punto de corte. El color debe ser similar o menos intenso que el del suero control negativo.

En la prueba de ELISA para cisticercosis, la positividad a títulos bajos (1/500, 1/1000) no garantizan o no concluye que dicho suero del paciente sea positivo a cisticercosis, más aun teniendo en cuenta que la prueba de ELISA presenta reacción cruzada con otros parásitos como *E.granulosus, F.hepatica e H.nana* (parásitos frecuentes en nuestro medio). La positividad a títulos 1/1000 o más, deben ser confirmadas por IB.

Perfil electroforético del Ag.LVC.T.solium semi purificado y prueba de IB para Diagnóstico de cisticercosis humana (Fig. 14, 15, 16)

ELISA presentó reactividad cruzada de *Teniasis* con *Hidatidosis, Fascioliasis*, teniasis por *Hymenolepis nana* y *Esquistosomiasis*, y en la prueba de IB corresponde a la banda de precipitación cuyo PM es 42 y 39 KDa.

La mejor resolución para el Ag.LV.*T.solium* total es, Huancayo (HCYO.M) total es 1,15 µg/mm, para el antígeno total Ayacucho (AYAC) es 0,82 µg/mm y para el antígeno HCYO.L es 0,62 µg/mm (Fig. 14 Ag.LV.*T.solium* mix semi purificado y Fig. 15). El

suero de los pacientes con cisticercosis, con la prueba de IB reconocieron a más de una de las 8 bandas proteicas de diagnóstico entre 35 y 13 Da. [20] (Fig. 16)

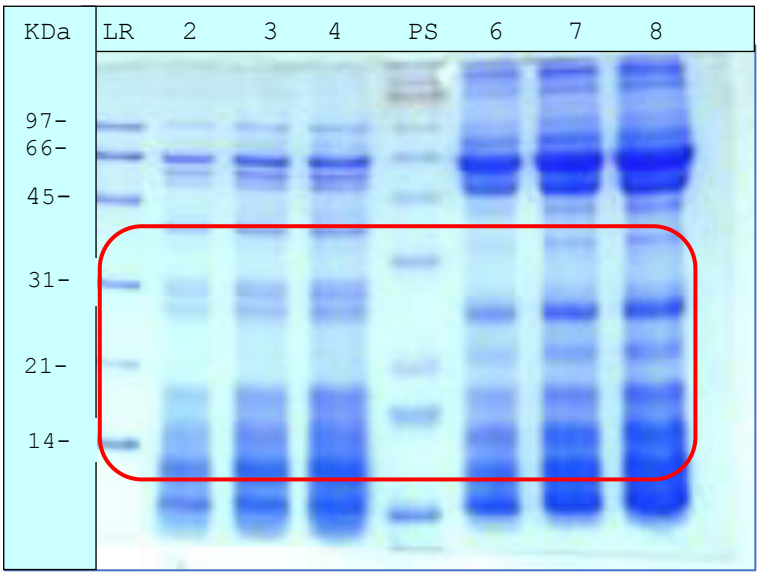


Fig. 14: Perfil electroforético del Ag.LVC en gel de poliacrilamida. Mix semi purificado (pocillo 2, 3, 4) y Ag.LVC.total (pocillo 6, 7, 8) [20]

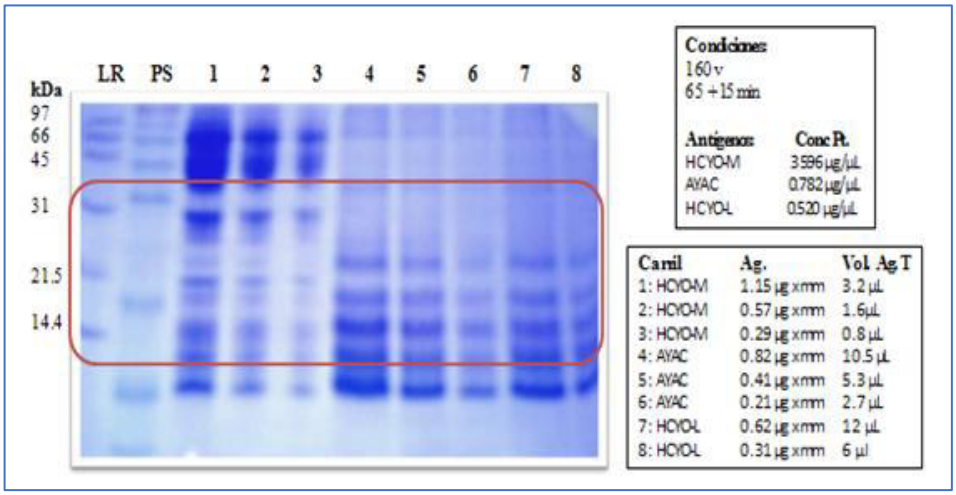


Fig. 15: Perfil Electroforético de Ag.LVC.*T.solium* nativo. Total (pocillo 1, 2, 3) y semi purificado (pocillo 4, 5, 6, 7, 8) de Junín-Hcyo (M, L) y Ayacucho [20]

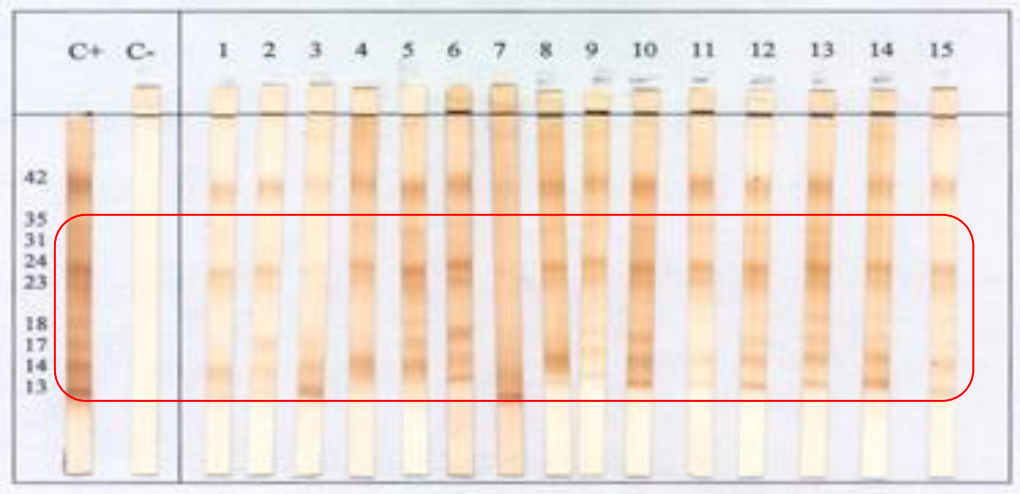


Fig. 16: Prueba Inmunoblot para Diagnóstico cisticercosis humana con Ag.LVC.*T.solium* (mix Ag.nativo). El criterio de positividad es el reconocimiento de una o más bandas: PM 13, 14, 17, 18, 21, 23, 24, 31 y 35 KDa. [20]

Interpretación de resultados

Los resultados de la prueba EITB o IB o reacción inmunoenzimática con Ag.LVC. *T solium*-semi purificado, se muestran en la Figura Nº 16. Los anticuerpos del suero de los pacientes con cisticercosis generalmente reconocieron a más de una de las 8 bandas de diagnóstico o polipéptidos del Ag.LVC. *T. solium* semi purificado: 35, 31, 24, 23, 18, 17, 14 y 13 kDa, descartando las bandas mayores de 35 KDa. Con el Ag. LVC. *T. solium* total se visualizaron las bandas: 6, 10, 12, 13, 14, 17, 18, 21, 23, 24, 31, 35, 42-45, 66, 95, 97 y 100 KDa.

Los sueros de pacientes con *cisticercosis, equinococosis, fascioliasis, esquistosomiasis y teniasis* por *H. nana*, mostraron reactividad cruzada con las bandas de peso molecular inespecíficas 42 y 39 KDa. por ello no son consideradas.

La prueba de EITB (IB) utilizando Ag.LVC. *T. solium* mix nativo purificado frente a los sueros de la seroteca del Lab.Z.P-INS presentaron 100% de sensibilidad y 100% de especificidad. No se presentaron falsos positivos ni falsos negativos con la prueba de IB (Ver Tabla 4) [20].

Tabla 4. Prueba de electroinmunotransferencia (EITB) o IB con Ag.LVC. *T.solium* nativo purificado frente a sueros de pacientes sanos, con cisticercosis y otras parasitosis (Seroteca del Lab.Z.P-INS) [20].

	IB (+)		IB (-)		Total	
	n	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**
Cisticercosis	50	100	0	0	**50**	**50**
Hidatidosis	0	…	10	20	**10**	**10**
Chagásicos	0	…	5	10	**5**	**5**
Toxoplasmosis	0	…	5	10	**5**	**5**
Leishmaniosis	0	…	5	10	**5**	**5**
Fasciolosis	0	…	5	10	**5**	**5**
Sanos	0	…	20	40	**20**	**20**
Total	**50**	**100**	**50**	**100**	**100**	**100**

CAPÍTULO V
DISCUSIÓN

En nuestro país hay diferentes investigaciones, especialmente en el Ministerio de Salud, para el diagnóstico inmunoserológico de la cisticercosis humana mediante las pruebas de ELISA, Inmunoblot entre otros. Para la purificación del antígeno de líquido vesicular de cisticercos de *Taenia solium* procedentes de porcinos parasitados naturalmente, se han realizado varios estudios con Ag. total, con Ag. total semi purificado y con el Ag. purificado, éste último mediante cuatro métodos de purificación (sulfato de amonio, cromatografía de afinidad con lectina de lentejas-sefarosa, Sefadex-G75 y electro-elución) [20, 36]

El cisticerco de *T. solium* nos permite obtener varios tipos de material antigénico, el antígeno total (con fluido y membrana), antígeno de membrana, antígeno de excreción secreción, antígeno de corpúsculos calcáreos y antígeno de fluido o Líquido Vesicular de Cisticerco total (Ag.LVC. *T. solium*). El Ag.LVC es relativamente de fácil preparación, utilizado por el CDC-USA (Ag.LVC. *T. solium* purificado), y es una alternativa como material antigénico.

Según Tsang del CDC-USA **[21]**, el líquido vesicular debe tener una concentración proteica de 3 a 6 µg/µL. En nuestro país, no se encontró referencia bibliográfica sobre la cuantificación proteica.

En el estudio se obtuvo como máximo una concentración proteica de 3,6 µg/µL del Ag.LVC. *T. solium* semi purificado de cerdos parasitados naturalmente procedentes de las zonas endémicas de Perú (Tabla 1), trabajo publicado el 2015 **[20]** y 2014 **[36]**, la concentración proteica está dentro de los parámetros considerados por Tsang **[21]**.

La variación de las concentraciones entre las zonas del país consideradas en este estudio se desconocen sus factores que pueden ser, por el trabajo de campo y de laboratorio realizado (procedencia, tamaño del cisticerco, tiempo de obtención del LVC, cadena de frío, variabilidad genética en las diferentes zonas endémicas, entre otros).

Coker-Vann et al, obtuvieron el 80% de positividad en suero con antígeno preparado por

cromatografía de intercambio iónico. Montenegro, determinó una dilución discriminativa de 1/2500 para el extracto crudo y de 1/500 para el extracto precipitado con sulfato de amonio, otros autores como Nascimento et al, emplearon una dilución discriminativa de 1/256 en la que no se observaron reactividad cruzada con otras parasitosis [20, 21, 48, 49, 50].

En la investigación, con la prueba de ELISA, el punto de corte fue de 0,125 y la dilución discriminativa del suero de paciente fue 1/1000 para el Ag.LVC. *T. solium* semi purificado con sulfato de amonio. De 375 muestras de suero humano procesadas, 66 (17,6%) resultaron ELISA positivos, siendo el título más bajo 1/500 y el título más alto 1/64000. De los sueros ELISA positivos, 14/66 (21,2%) fueron confirmados por IB como positivos y corresponden a ELISA cuyo título es 1/1000.

El Instituto Nacional de Salud de Colombia [47] citó las siguientes seroprevalencias de NCC: Brasil 3,0-5,6%; México 1,3-10,0%; Perú 7,1-26,9%; Honduras 15,6-17,0%; Ecuador 2,6-14,3%; Guatemala: 10-17%; Bolivia: 22%; Venezuela: 4-36,5%; Colombia: 1,8-2,2%. Donde Perú se encuentra entre los países con la más alta seroprevalencia.

Desde el punto de vista epidemiológico los métodos de diagnóstico inmunoserológicos (ELISA, Inmumnoblot) son necesarios aun cuando presentan limitaciones en su sensibilidad y especificidad (Dorny *et al.*) [50].

Montenegro en Perú obtuvo una sensibilidad de 82% en suero y 94% en LCR para el extracto crudo (EC) y para el extracto precipitado con sulfato de amonio de 73% en suero y 78% en LCR y obtuvo una especificidad de 76% en suero y 93% en LCR por ELISA. La prueba de ELISA utilizando antígeno extracto total, presenta alta sensibilidad (81%) y tiene baja especificidad (92%), pues genera falsos positivos por las reacciones cruzadas que presenta con *Hidatidosis (Echinococcus granulosus), teniasis* por *Hymenolepis nana*, *Esquistosomiosis, Fascioliasis* [19, 21, 49, 50, 51]**.** Sin embargo, existen pruebas de laboratorio más accesibles y económicas, aunque su sensibilidad y especificidad no sean las mismas [22].

En el estudio serológico de pacientes con sospecha de cisticercosis se demostraron con la prueba de ELISA una alta sensibilidad (100%) y baja especificidad (85,6%), a la dilución

1/1000. ELISA presentó reactividad cruzada con *Hidatidosis, fascioliasis, teniasis* por *Hymenolepis nana* y *esquistosomiasis.*

La prueba de Inmunoblot (IB), EITB o western blot, fue reconocida por la OPS como el método de elección en el diagnóstico de la neurocisticercosis [11, 29, 48, 45, 49], reportándose alta sensibilidad (85,7%) y alta especificidad (93,9%) [51]. Otros autores como Nascimento *et al.* obtienen el 100% de sensibilidad al emplear antígeno purificado por anticuerpos monoclonales, Davelois [19] y Escalante [10], afirman que EITB o IB tiene alta sensibilidad (91-98%) y alta especificidad (100%) en la detección de anticuerpos tipo IgG en pacientes con cisticercosis cuando el inmunodiagnóstico se realiza con antígeno purificado.

Ferrer [48], estandarizó una prueba de Electroinmunotransferencia (EITB) con antígeno de excreción/secreción de *T. solium*, y se obtuvieron 95% de sensibilidad y 100% de especificidad, y se detectaron teniasis en Guatemala, Perú e Indonesia (Wilkins et al) [51]. Por otro lado, Tsang [21] con antígeno purificado determinó 98% de sensibilidad y 100% de especificidad en el diagnóstico de cisticercosis, también citado en un artículo por Greene *et al*. [52].

En el estudio con la prueba de Inmunoblot (IB) se ha determinado una sensibilidad 93,5% y una especificidad 100% (Tabla 3 y 4) en suero de paciente a la dilución diagnóstica de 1/50, utilizando Ag.LVC. *T. solium* semi purificado, lo cual coincide con los resultados de Ferrer [48] y Tsang [21].

En diferentes estudios se han reportado varias proteínas, una antigénica de 14kDa. en extracto crudo de *T. solium* [45], una de metacéstodo de *T. solium* de 20kDa. con potencial diagnóstico por ELISA en LCR de pacientes con neurocisticercosis [45], glicoproteínas diagnósticas de 24 y 14 kDa. de *T. solium*, a quienes se les cambió su conformación y se incrementaron más epítopos antigénicos lo que permitió mejorar su sensibilidad de diagnóstico en pacientes con un solo quiste en suero sanguíneo frente a antígenos de *T. solium* [46], una glicoproteína de 22 kDa en líquido de cisticerco de *T. solium*, también una proteína de 8 kDa. para diagnóstico de *T. solium* [47].

Tsang *et al* [21] purificaron siete glicoproteínas entre GP13, GP50 de *T. solium* para la

prueba de Western blot, citado por Ferrer [48] y Escalante [10] y son similares a las obtenidas en el estudio: 45, 42, 35, 31, 24, 23, 18, 17, 14 y 13 KDa [49, 12, 10].

En la investigación se determinó que los anticuerpos del suero de pacientes con cisticercosis, con la prueba de IB, generalmente reconocieron a más de una de las 8 bandas proteicas de diagnóstico consideradas: 35, 31, 24, 23, 18, 17, 14 y 13 KDa. (Figura 11). Estas glicoproteínas referentes fueron consideradas por Escalante [10] y Ferrer [46]. Por otro lado, en los anticuerpos del suero de pacientes con cisticercosis, procesados con el Ag.LVC. *T. solium* total, se visualizaron las bandas: 6, 10, 12, 13, 14, 17, 18, 21, 23, 24, 31, 35, 42-45, 66, 95, 97 y 100 KDa.

En estudios preliminares se ha demostrado que, cisticercosis por *T. solium* con la prueba de IB da reacción cruzada con otras parasitosis como *Echinococcus granulosus*, *Fasciola hepatica* e *Hymenolepis nana* en las bandas GP 42-39KDa [24, 53], por lo que fueron consideradas bandas específicas diagnósticas entre 13 a 35 KDa, utilizando Ag.LVC. *T. solium* semi purificado.

El Ag.LVC. *T. solium* semi purificado evaluado con ELISA tuvo sensibilidad 100% y especificidad 85,6%, con Inmunoblot tuvo sensibilidad 93,5% y especificidad 100%, lo que indica que las fracciones semi purificadas del antígeno de fluido vesicular de cisticerco de *T. solium* tienen potencial para ser considerados y ser utilizados como antígeno para el diagnóstico y para el programa de control de cisticercosis humana en el país.

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES

1.- El Ag.LVC. *T. solium* tratado con sulfato de amonio permitió obtener diferentes fracciones antigénicas a partir del Ag.LVC. *T. solium* semi purificado por electroforesis.

2.- La prueba de ELISA en suero de pacientes con sospecha de cisticercosis con la mayor dilución evaluada (1/1000) mostró una sensibilidad de 100% y una especificidad de 85,6%. Y la prueba de Inmunoblot con el Ag.LVC. *T. solium* semi purificado, tuvo una sensibilidad del 93,5% y especificidad del 100% en suero a una dilución diagnóstica de 1/50. Por lo tanto, las fracciones antigénicas del LVC.*T.solium* son más sensibles y específicas.

3.- La concentración proteica del antígeno de líquido vesicular de cisticerco de *T. solium* (Ag.LVC. *T. solium*) y semi purificado utilizada fue de 3,6 µg/µL, obtenida del músculo de cerdos parasitados naturalmente, procedentes de Huancayo-Junín (zona endémica).

4.- El Ag.LVC. *T. solium* semi purificado frente a los anticuerpos del suero de pacientes con cisticercosis diagnosticados con la prueba de ELISA, presentaron reactividad cruzada con otras parasitosis como *Echinococcus granulosus*, *Fasciola hepatica* e *Hymenolepis nana* y en IB corresponden a las bandas GP 42-39KDa.

5.- Las bandas específicas para el diagnóstico de la cisticercosis se encuentran entre los PM 13 a 35 KDa, cuando se utilizó el antígeno semi purificado.

RECOMENDACIONES

1.- En estudios epidemiológicos, utilizar la prueba de ELISA a la dilución de 1/1000 como prueba tamiz por la facilidad en su ejecución y ser una prueba muy sensible (100%).

2.- Una prueba de ELISA positivo con una dilución mayor a 1/1000 debe confirmarse con una prueba molecular IB con 100% de especificidad, porque ELISA tiene baja especificidad (85,6%) y presenta reacción cruzada con otros parásitos como: *E.granulosus, F.hepatica, H.nana* (parásitos frecuentes en el medio).

3.- Utilizar Ag.LVC. *T. solium*-semi purificado para evitar reacciones cruzadas con otras parasitosis, e inmunizar animales de laboratorio para producir antisuero hiperinmune.

4.- Los estudios de diagnóstico de cisticercosis deben realizarse en muestras de suero sanguíneo y no en muestras de LCR, porque los anticuerpos se manifiestan primero en suero y de esa manera evitar falsos negativos.

5.- En estudios posteriores se puede purificar el Ag.LVC. *T. solium* nativo para producir kit de diagnóstico con tiras reactivas para IB, pruebas rápidas, antígeno recombinante, desarrollar vacunas, etc.

6.- Las fracciones semi purificadas del fluido vesicular de cisticerco de T. solium debido a su potencial, se recomienda su evaluación para uso como antígeno en el diagnóstico de cisticercosis humana, aspecto importante en salud pública, impactada por la prevalencia de la enfermedad y para mejorar la eficiencia de las pruebas de inmunodiagnóstico (ELISA e Inmunoblot).

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1.- Náquira, C. Situación de la HIdatidosis en el Perú. 1993. Memorias de la Reunión del Grupo Científico sobre Avances en el Prevención, Control y Tratamiento de la Hidatidosis. 26-28 de Octubre de1994. Pg.230-241. Pub. OPS/OMS 1994.

2.- Diaz, F.; García, H.H.; Gilman, R.H.; Gonzales, A.E.; Castro, M.; Tsang, V.C.W.; Pilcher, J.B.; Vasquez, L.E.; Lescano, M.; Carcamo, C.; Madico, G.; Miranda, E. 1992, and the Cysticercosis Working Group in Peru. Epidemiology of taeniasis and Cysticercosis in a Peruvian Village. American Journal of Epidemiology. Vol. 135. N°8. Printed in USA.

3.- Inope, C.L.; Rojas C.M. y Ballón, L.E. 1977. Cisticercosis en el Perú. Algunos aspectos estadísticos. Rev.Neuropsiquiatr. 40:40-49.

4.- García, H.H.; Martínez, M.B.; Gilman, R.; Herrera, G.; Tsang, V.E.W.; Pilcher, J.V.; Diaz, F.; Verástegui, M.; Gallo, C.; Porras, M.; Alvarado, M.; Naranjo, J. y Miranda, E. 1991. Diagnosis of Cysticercosis in Endemic Regions. The Lancet 338:549-551.

5.- Diaz, J.F.; Verástegui, M.; Gilman, R.H.; Tsang, V.; Pilcher, J.; Galllo, C.; García, H.H.; Torres, P.; Montenegro, T.; and Miranda, E. 1992. Immunodiagnosis of Human Cysticercosis. **Taenia solium**: A Field Comparison of an Antibody Enzyme Linked Immunosorben Assay (ELISA), an Antigen ELISA and Enzyme-Lynked Immunoelectro Transfer Blot (EITB) Assay in Peru. Am.J.Trop.Med.Hyg. 46(5):610-615.

6.- OPS–OMS "Epidemiología y control de la teniasis-cisticercosis en América Latina". Versión 1, 1993; REF:PNSP. 91-98.

7.- Nahajan, R.C.; Chitkara, N.L. and Chapra, J.S. 1974. Evaluation of Cysticercus and Adult Worm Antigens in Serodiagnosis of Cysticercosis. Indian J.Med.Res. 62:1310-1313.

8.- Kim, Ch. and Yang, J. 1988. Immunological Characterization of Antigens from Cysticercus and Sparganum and Their Application to Immuno Diagnosis Immunological Characterization of Crude Antigenic Components from **Cysticercus cellulosae**. Korean J.Parasit. 26:154-245.

9.- Tsang, V.C.W.; Brand, J.A.; Wey, Z.; Boyer, E.A.; Kamango-Sollo, I.P.; Rhoads, M.L.; Murrell, D.; & Schantz, P.M. 1990. Modulated expression of distinct IgM. and IgG activities to *Taenia solium* antigens in experimentally infected pigs: A possible model for human cysticercosis. Vet. Parasitol.

10.- Escalante H, Miranda E, Lorca M, Verástegui M. La técnica de «western blot» con antígenos de fluido vesicular de *Cysticercus cellulosae* para el diagnóstico de la cisticercosis. [Internet]. Boletín Peruano de Parasitología. 1995; 11 (1):26-31. [Citado May 2019]. Disponible en:

http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/parasitologia/v11_n1/pdf/a07v11n1.pdf

11.- Organización Panamericana de la Salud-Organización Mundial de la Salud-OPS-OMS. Teniasis y cisticercosis. [Internet] OMS; 2019. [Citado 21 May 2019]. Disponible en:
https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/taeniasis-cysticercosis

12.- Falcón Pérez NG. Efecto de la edad en un modelo de infección experimental de cisticercosis porcina. [Tesis EP Medicina Veterinaria]. Lima: Universidad Nacional San Marcos; 2006. [Citado el 20-junio-2020]

13.- Organización Mundial de la Salud-OMS. Teniasis y cisticercosis. [Internet]. Ginebra: OMS-2018; [Citado May.2019]. Disponible de:
https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/taeniasis-cysticercosis

14.- Vidal S. Comunicación de un caso de cisticercosis subcutánea. Rev chil Infectol. 2013; 30(3): 323-325. [Internet]. 2013 Jun [citado 2021 Jul 17]; 30(3): 323-325. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182013000300009&lng=es.
http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000300009.

15.- García HH, González AE, Rodríguez S, Gonzálvez G, Llanos-Zavalaga F, Tsang VCW, et al. Epidemiología y Control de la Cisticercosis en el Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2010; 27(4): 592-97. [Citado Dic..2020]. [Internet] Disponible en:
https://pesquisa.bvsalud.org

1**6.-** Ayala E, Medina SA, Morales J. Cisticercosis humana y su asociación con factores epidemiológicos y clínicos en los Andes centro y sur de Perú, 2000-2001. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2014; 18(1):1-6. Sociedad Peruana de Epidemiología Lima, Perú. [Citado Dic..2020]. [Internet] Disponible en:
https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=203131355005

17.- Araujo ChM, Hernández PE. Eficacia de tratamiento antiparasitario con albendazol en la neurocisticercosis sintomática: revisión sistemática y metaanálisis. [Tesis de pregrado]. Piura: Facultad de Ciencias de la Salud Escuela Profesional de Medicina Humana, Universidad Nacional de Piura; 2019. [Citado Dic..2020]. [Internet] Disponible en: http://repositorio.unp.edu.pe/handle/UNP/1628

18.- Pawlowski Z, Allan J, Sarti E. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: From research towards implementation. Int J Parasitol. 2005; 35(11–12): 1221–32. [Citado Dic..2020]. [Internet] Disponible en: doi: 10.1016 / j.ijpara.2005.07.015.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16143335/

19.- Davelois K, Escalante H, Jara C. Rendimiento diagnóstico del Western Blot para detectar simultáneamente anticuerpos en pacientes con cisticercosis, hidatidosis y fascioliasis humana. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2016. *33*(4): 616-624. [Citado May 2019]. Disponible en:
https://rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/2543/2571

20.- Ayala-Sulca E, Miranda-Ulloa E. Evaluación de electroinmunotransferencia utilizando antígeno mix nativo purificado de líquido de cisticerco de *Taenia solium* para el diagnóstico de cisticercosis humana. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2015; 32(3): 485-491.
Disponible en: http://www.rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/1678.
doi:http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2015.323.1678.

21.- Tsang VC, Brand J, and Boyer AE. An Enzime-Linked Inmunoelectrotransfer Blot Assay and Glycoprotein Antigens for Diagnosing Human Cysticercosis (*Taenia solium*). J Infect Dis. 1989; 159(1): 50-59. [Citado May 2019]. Disponible en:
http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/parasitologia/v11_n1/pdf/a07v11n1.pdf

22.- Gómez A, Morón A, Beltrán HF. Fraccionamiento de un Antígeno Crudo de *Cysticercus cellulosae*. Rev Salud Publ Mex. 1997 19(3):421-430. [Citado May.2019]. [Internet] Disponible en:
http://bibliotecasibe.ecosur.mx/sibe/book/000018814

23.- Larralde C, Aline S. Cisticercosis: Guía para profesionales de la salud (Biblioteca de la cultura). (autores, editores). [Internet] Fondo De Cultura Económica Estados Unidos. Editorial: Fondo de Cultura Económica, 2006; 2005. [Citado en May 2019]. ISBN 968168138X, 9789681681388. Disponible en:
https://www-lab.biomedicas.unam.mx/cistimex/s1/CistiBook.pdf

24.- Botero D, Restrepo M. Parasitosis Humanas. 5ª ed. Medellín, Colombia: Fondo editorial CIB; 2012.

25.- Morales Flores MA**.** Cisticercosis y teniasis. [internet]. Correo del Maestro Núm. 106**.** 2005. [Citado en May 2019]. disponible en:
https://www.correodelmaestro.com/pruebas/anteriores/2005/marzo/1anteaula106.htm

26.- Rivera Santillán AM. Evaluación de nuevos anticuerpos monoclonales para identificar antígenos de corpúsculo calcáreo de cisticerco de *Taenia solium*. [Tesis Maestría en Biotecnología]. Lima-Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2017. [Citado en May 2019]. Disponible en:
http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/7051/Rivera_sa.pdf?1.

27.- Garcia HH, O'Neal SE, Noh J, Handali S, Cysticercosis Working Group in Peru. Laboratory Diagnosis of Neurocysticercosis (Taenia solium). J Clin Microbiol. 2018 Aug 27;56(9). pii: e00424-18. doi: 10.1128/JCM.00424-18.

28.- Palomino F. Diagnóstico de la incidencia de virus en papas nativas en comunidades campesinas de la Provincia de Canchis. INIA-Cusco. [Internet]. [Citado abril 2019. Disponible en:
https://www.solucionespracticas.org.pe/Descargar/406/3798

29.- Grogl M, Estrada JJ, MacDonald G, Kuhn RE. Antigen-antibody Analyses in neurocysticercosis. J Parasitol. 1985 71: 433 - 442. [Citado May.2019]. [Internet] Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2411903/

30.- Rodriguez S, Wilkins P, Dorny P. Immunological and molecular diagnosis of cysticercosis. Pathog Glob Health. 2012;106(5):286-98.

31.- Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Roitt Inmunología: Fundamentos. 12a Ed. Buenos Aires: Edit.Médica Panamericana; 2014.

32.- Del Brutto O, Nash T, White A, Rajshekhar V, Wilkins P, Singh, García H. Revised diagnostic criteria for neurocysticercosis. Journal of the neurological science. 2017. 15(372), 202- 210.

33.- Fernández P, Díaz P. Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. Cad Aten Primaria. 2003; 10: 120-124.

34.- Schantz MM, Shanks D, Wilson M. Serologic cross-reactions with sera from patients with echinococcosis and cysticercosis. Am.J.Trop.Med.Hyg. 1980; 29(4):609-12.

35.- Flisser A. Control de la teniasis y la cisticercosis en México. XV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Simposio Complejo teniasis-cisticercosis. Biomédica 2011; 31(sup.3):3-315 27. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Luis_Vasquez11/publication/315655367_Simposio_complejo_teniasis_y_cisticercosis/links/58d87031a6fdcc1baeb8ed31/Simposio-complejo-teniasis-y-cisticercosis.pdf

36.- Ayala E, Miranda E. Cuantificación proteica del líquido vesicular de cisticerco de *Taenia solium* [carta]. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2014; 31(1):175-6. Disponible en: www.redalyc.org/pdf/363/36331026030.pdf www.ins.gob.pe/insvirtual/images/revista/pdf/rpmesp2014.v31.n1.pdf

37.- Rodríguez C. Parasitosis Intestinales. Salud y medicina [Online]. Instituto Santa María-México. 31-marzo-2015. Disponible en: (https://es.slideshare.net/dracrm/parasitosis-intestinales-46509028)

38.- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC 24/7). Última revisión de la página: 10-enero-2013. Fuente del contenido: Salud Global , División de Enfermedades Parasitarias y Paludismo https://www.cdc.gov/parasites/taeniasis/biology.html.

39.- Roa.T.V. Salud y medicina, Tecnología. Organización Internacional de Desarrollo de la Atención Médica (mcdinternational.org). 28-jul-2012 https://es.slideshare.net/doctorrao/*taenia-solium* https://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/dpdx/HTML/Frames/S-Z/Taeniasis/body_Taeniasis_mic1

40.- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Parásitos-teniasis: Preguntas frecuentes sobre la teniasis [Online]. USA; CDC-página revisada el: 10-enero-2013]. Disponible en: https://www.cdc.gov/parasites/taeniasis/es/informativa/preguntas.html

41.- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Parásitos-cisticercosis: Preguntas frecuentes sobre cisticercosis [Online]. USA; CDC- página revisada el: 18-octubre-2016]. Disponible en:
https://www.cdc.gov/parasites/cysticercosis/es/informativa/preguntas.html

42.- Instituto Nacional de Salud - Ministerio de Salud-Perú. Técnica de Inmunoblot para el Diagnóstico de Hidatidosis y Cisticercosis Humana: Manual de procedimientos para el diagnóstico de las zoonosis parasitarias: Serie NTP N°32. 2da.ed. Lima-Perú 2010. Pg.35-45. [Citado May.2019]. [Internet] Disponible en:
http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1585.pdf

43- García Pérez HM. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Univ Diag. 2000;1(2):31-41.

44- Levine MZ, Lewis MM, Rodriguez S, Jimenez JA, Khan A, Lin S, et al. Development of an enzyme-Linked Immunoelectrotransfer blot (EITB) assay using two baculovirus expressed recombinant antigens for diagnosis of Taenia solium taeniasis. J Parasitol. 2007;93(2):409-17.

45.- Hancock, K., Khan, A., Williams, F., & Yushak, M. 2003. Characterization of the 8-kilodalton antigens of Taenia solium metacestodes and evaluation of their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis. The journal of Clinical Microbiology, 41, 2577–2586.

46.-Ferrer E. Teniasis/Cisticercosis: Epidemiología y Control. Adelantos en la producción de vacunas. Boletín de Malariología y Salud Ambiental. Vol. XLV, Nº 2, agosto-diciembre, 2005. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/265208851_TeniasisCisticercosis_Epidemiologia_y_Control_Adelantos_en_la_produccion_de_vacunas

47.- Instituto Nacional de Salud (INS), República de Colombia. Cisticercosis: Situación de la parasitosis [Internet]. Colombia. [Actualizado 2009 nov. Consulta 2015 may]. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/ Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20 Evento%20 Epidemiolgico/Cisticercosis%20 2009.pdf.

48.- Ferrer E. Teniasis/Cisticercosis: Avances en diagnóstico inmunológico y molecular. Boletín de Malariología y Salud Ambiental. *versión impresa* ISSN 1690-4648. Bol Mal Salud Amb. Maracay jul. 2006; 46 (1): 1-13.

49.- Cardona-Arias JA, Carrasquilla-Agudelo YE, Restrepo-Posada DC. Validez de tres métodos de inmuno-diagnóstico de neurocisticercosis: revisión sistemática de la literatura con metaanálisis 1960-2014. Artículo original. Parasitología. Rev chilena Infectol 2017; 34 (1): 33-44. www.sochinf.cl

50.- Dorny, P., Brandt, J., Zoli, A., & Geerts, S. 2003. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. Acta Tropica, 87(1), 79-86.

51.- Wilkins PP, Allan J C, Verastegui M, Acosta M, Eason AG, García HH, et al. 1999. Development of a serologic assay to detect Taenia solium Taeniasis. Am. J. Trop. Med.

Hyg. 60: 199-204. [Links]

52.- Greene R. M., Hancock K., Wilkins P. P. & Tsang V. C. 2000. Taenia solium: molecular cloning and serologic evaluation of 14 and 18 kDa related, diagnostic antigens. The Journal of Parasitology, 86(5), 1001-1007. [Links]

53.- Yang, H. 2000. Separation of calcareous corpuscles from plerocercoids of Spirometra mansoni and their binding proteins. Parasitology Research, 86(9), 781-782.

54.- García HH, González AE, O'Neal SE, Gilman RH. Apuntes y recomendaciones para el establecimiento de programas de control de la teniasis / cisticercosis por *Taenia solium* en el Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2018; 35(1): 132-138.

CAPÍTULO VIII

ANEXOS:

ANEXO 1

MÉTODOS Y OBTENCIÓN DE DATOS

LIOFILIZACIÓN

Liofilización *del Líquido o Fluido Vesicular de Cisticerco* (LVC) *de T. solium*.



Fig. 5.- Liofilización del Ag. LVC.*T.solium*-semi purificado

FLUJOGRAMA

CISTICERCO - LVC

↓ - Inhibidor de proteasas -

LVC - [Prot.]

↓ Centrifugar 9000 g/ 15 mins. 4°C

SOBRENADANTE — **SEDIMENTO**

- Perfil Prot.Ag. { ST, CT

↓

PRECIPITAR

↓

- Con $(NH_4)_2 SO_4$ 20% en agitación magnética x 30' 4°C
- Centrifugar 21000 rpm /20' 4C ..... { - Sob.: Perfil Prot. / - Sed.: Perfil Prot.
- Diálisis (8 KDa) - Tris-HCl
- [Prot.]
- Perfil Prot. (Ag) { ST, CT

RECUPERAR

↓

- Determinar [Prot] (Bradford, Lowry)
- Técnica ELISA
- Electroforesis (gel poliacrilamida SDS-PAGE)
- Perfil Prot. Ag. { ST, CT
- Fracciones proteicas (IB)
- Transferencia: Tiras reactivas: Técnica IB

ALMACENAR Con Glicerol 6% a –70° C ó a –80ºC

***** CT y ST: Con y Sin Tratamiento.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL LABORATORIOS DE SALUD PUBLICA

DIRECCION EJECUTIVA DE LOS LABORATORIOS DE REFERENCIA
DIVISION DE PARASITOLOGÍA LABORATORIO DE ZOONOSIS
Tlf. 4719920-137 Tlf.FAX 4712529 Apdo 451 Lima

PROYECTO DE INVESTIGACION

TASA DE MORBILIDAD HOSPITALARIA DE LAS ZOONOSIS PARASITARIAS: HIDATIDOSIS, CISTICERCOSIS, TOXOPLASMOSIS EN LAS ZONAS ENDÉMICAS DE PERU (Aprobado por Comisión de Ética-INS)

FICHA CLINICA EPIDEMIOLOGICA PARA EL ESTUDIO DE LAS ZOONOSIS

DATOS DE LA INSTITUCION

DISA:.....
ESTABLECIMIENTO DE SALUD:.....
DIRECCION:..... TELEF./FAX:.....

DATOS GENERALES DEL PACIENTE:

NOMBRES Y APELLIDOS
.....EDAD.....SEXO.....
.
PROCEDENCIA: DIST:.....PROV:.....DPTO:.....
OCUPACIÓN.....DOMICILIO
ACTUAL.....
SERVICIOS DE: AGUA ( ) DESAGUE ( ) BAÑO ( ) LETRINA ( )
SINTOMATICO* ( ) **ASINTOMATICO ** (**)
FECHA DE INICIO DE SINTOMAS:.....
FECHA DE OBTENCION DE MUESTRA:.....
DIAGNOSTICO PRESUNTIVO:.....
RECIBIO TRATAMIENTO: (SI) (NO)
....
.....
CONTACTO CON ANIMALES:.....
CRIANZA DE: CERDOS ( ) **GATOS** ( ) **PERROS** ( ) **GANADO** ( )
SINTOMAS Y SIGNOS:
.- DIAGNOSTICO NEUROCISTICERCOSIS ( )..... CONVULSIONES (....)
.- HIDATIDOSIS: QUISTE HEPATICO Y/O PULMONAR ( )
.- TOXOPLASMA: RETINITIS O LESIONES OCULARES POSTERIOR ( )
ABORTOS A REPETICION ( )
MUESTRAS: SUERO SANGUINEO ( )

* **Persona Sintomática: Aquellas que presentan los diagnósticos clínicos.**
** **Persona Asintomática: Aquellas que concurren al Hospital por Diagnóstico diferente a los arriba mencionados o por otros motivos.**

Fecha: _____ SELLO Y FIRMA DEL SOLICITANTE

ANEXO 2

REACTIVOS, MÉTODO LOWRY, CUANTIFICACIÓN PROTEICA

Sulfato de amonio 20%:

Solución saturada de $(NH_4)_2S0_4$ en agua destilada, de pH 7,2.

Sulfato de amonio ……. 20,0 g

Agua destilada ……..... cs.100 ml

Solución salina amortiguada con fosfatos 0,01 M (SAF)

Solución madre I:

fosfato disódico, con 2 moleculas de agua (Na_2HP0_4 , $2H_20$) ….. 10,0 g

fosfato monopotásico (KH_2P0_4) …… 1,0 g

agua destilada . . . . . …… 1000 ml

Solución madre II:

cloruro sódico …… 8,5 g

agua destilada ……..1000 ml

Se mezclan 180 ml de la solución madre I con 900 ml de la solución madre II. El pH de la solución amortiguadora resultante debe ser 7,4-7,6.

MÉTODO LOWRY

Cuantificación de proteínas

Fundamento teórico

El método Lowry está basado en la cuantificación del color obtenido por la reacción del compuesto fenólico Folin-Ciocalteu con los residuos de aminoácidos aromáticos, formando un complejo con el reactivo de cobre que está asociado a los enlaces amida.

El método Lowry permite determinar la concentración de proteínas en un rango de 5µg a 250µg/mL, fuera de este rango el método es inexacto. Se diseñó una curva estándar con diferentes concentraciones de BSA y a partir de ésta se determinó la concentración de proteína problema por extrapolación. La lectura de la reacción se realizó a 700nm.

Preparación de reactivos:

a. Solución BSA (estándar para concentración de proteínas: 1mg/mL)
b. Stock 10X: 100mg.BSA en 10mL H_2O tri o bidestilada (agua bi.).
c. Buffer alcalino: Añadir 10,6gr. Na_2CO_3 y 1gr.Na(OH) en un frasco con 50mL de H_2O bidestilada, disolver y completar a 100mL.
d. Reactivo de cobre: Añadir 0,1gr.de $CuSO_4.5H_2O$ y 0,2 gr. Tartrato de Sodio y Potasio en un frasco con 50mL de H_2O bi., disolver y completar a 100 mL.

e. Reactivo de Folin-Ciocalteu: La solución comercial de Folin-Ciocakteu diluir ¼ veces con H_2O bi.

Protocolo:

1.- Agregar 1 mL. de muestra en tubos de ensayo.

2.- Agregar 1 mL. de buffer alcalino, mezclar y dejar reposar por 10 mins.

3.- Agregar 0,4 mL. de reactivo de Cu, mezclar y dejar reposar por 10 mins.

4.- Agregar 0,75mL.de reactivo Folin-Ciocalteu diluido, mezclar y se dejar reposar por 10 mins.

5.- Lectura en el espectrofotómetro a 700nm.

6.- Trazar la curva de calibración con los valores de absorbancia y hallar la concentración de muestra por extrapolación.

Interpretación de resultados

Reacción Positiva: - Si DO es mayor que el punto de corte (Cut off).

- La presencia de coloración amarilla nos indica reacción positiva, siempre que ella sea más intensa que el suero control negativo.

Reacción Negativa: - Si DO es menor que el título de corte.

- El color debe ser similar o menos intenso que el del suero control negativo.

Cuantificación de proteínas por el método Lowry

CUADRO 1: METODO LOWRY

BSA: 10mg/ mL.$H_2$0				**Ag.LVC.**			
REACTIVO\TUBO	1	2	3	1	2	3	BLANCO
BSAµL	40	60	80	-	-	-	-
Mo.Ag. µL	-	-	-	40	60	80	-
H_2O bid. ml	960	940	920	960	940	920	1000
BUFFER ALC. mL	1	1	1	1	1	1	1
REACTIVO Cu. mL	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
INCUBAR POR 10 MINUTOS (OSCURIDAD)							
FOLIN mL.	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
INCUBAR POR: 10 MINUTOS (OSCURIDAD)							

- Los tubos son por duplicado. Mo= Muestra
- El Liquido Vesicular debe tener [Prot.] de 3 - 6 µg./µL(Tsang). La lectura es a 700 nm. (Longitud de onda) y 100% (Transmitancia).

CUADRO 2: LECTURA (ABSORBANCIA)

TUBO	BK	BSA			Ag.LVC.		
		1	2	3	1	2	3
µL	-	40	60	80	40	60	80
A	0,11	0,141	0,156	0,156	0,2	0,22	0,22
B	0,121	0,132	0,158	0,152	0,2	0,222	0,22
X	0,1155	0,1365	0,157	0,154	0,2	0,221	0,22
DO=ABSORV-BK	-	0,021	0,415	0,0385	0,0845	0,1055	0,1045

DO: Densidad Óptica= [prot] 19 µg./ 80 µL

Determinación del error estándar (Ag.LVC.Huancayo-M):

Error Estándar = $\frac{\text{Desv.Estándar}}{\sqrt{n}}$ n = 3

Error Est.= $\frac{0{,}01184624}{\sqrt{3}}$ → Error Est.= 0,006839428 ~ 0,68%

CUADRO 3: CALCULOS DE BSA Y Ag.LVC.

ORDEN	BSA				MUESTRA Ag.LVC.	
	X µL.	Y = DO	XY	X^2	Ag. µL.	Y = DO
1	40	0,021	0,84	1600	40	0,0845
2	60	0,0415	2,49	3600	60	0,1055
3	80	0,0385	3,08	6400	80	0,1045
SUMA	180	0,101	6,41	11600	--	--

Cálculos de la concentración proteica: **(N=3)**

$$b = \frac{NSXY - SYSX}{SX^2(N) - SXSX} \qquad \frac{3(6,41) - 180(0,101)}{3(11600) - 180(180)} = \frac{1,05}{2400} = 0,0004375$$

$$a = \frac{SY - bSX}{N} \qquad \frac{0,101 - 0,0004375(180)}{3} = \frac{0,022}{3} = 0,0074$$

MUESTRA (Ag): [..... µg.Prot/ µL.] $X = \frac{Y - a}{b}$

$$X1 = \frac{0,0845 - 0,0074}{0.0004375} = \frac{176,223}{40\ \mu L} = 4,4075142$$

$$X2 = \frac{0,1055 - 0,0074}{0,0004375} = \frac{224,223}{60\ \mu L} = 3,7371428$$

$$X3 = \frac{0,1045 - 0,0074}{0,0004375} = \frac{221,943}{80\ \mu L} = 2,7742856$$

$$\bar{X} = 4,407 + 3,737 + 2,774 = \frac{10,917}{3} = \mathbf{3,639\ o\ 3,64\ \mu g./\ \mu L\ [prot]}$$

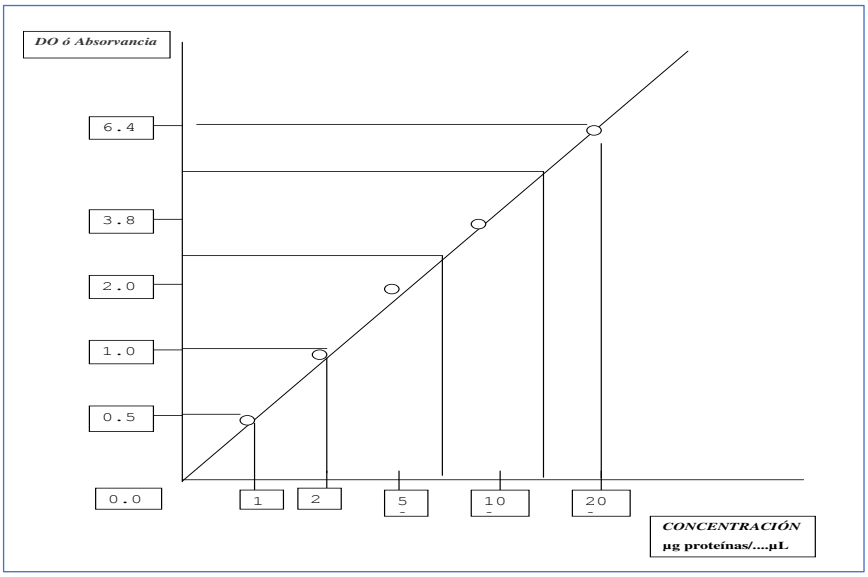


GRAFICO 1: Curva estándar (Lowry). Punto de Corte o Cut off (utilizar a o b).

a.- Determinación del Punto de Corte (Cut-off)

Se puede utilizar alguno de los siguientes criterios:

El valor aproximado será el determinar la línea de corte con los valores más altos en la lectura u observación de color de los sueros negativos.

El valor más real será cuando se hace las determinaciones de la desviación estándar de los valores de lectura (Densidad Óptica=DO) de los sueros conocidos positivos y de los valores de los sueros negativos. El punto de cruce entre el valor inferior de la suma del promedio -3 desviaciones estándares de los sueros positivos y el valor máximo de la suma del promedio +3 desviaciones estándares de los sueros negativos, se considera como el punto de corte, que permite decir la probabilidad de la infección cuando el valor de lectura está por encima de ese valor o negatividad de la infección cuando dicho valor está por debajo del punto de corte.

b.- Punto de Corte o Cut off (OMS - OPS)

Para definir el valor de corte deberá estudiarse por Ensayo Inmuno Electroforético (EIE) o ELISA un número significativo de muestras de pacientes no infectados con cisticercosis que habitualmente concurren al servicio y de pacientes con cisticercosis confirmada. La selección de los controles se hace teniendo en cuenta el valor de corte definido. Se prepara un control negativo, un control positivo bajo y un control positivo alto. El control negativo debe tener un valor de DO igual al valor promedio de la DO de la población no infectada más 3 veces su desviación estándar (X + 3 d.s.). El control positivo bajo debe tener un valor de DO igual al nivel de corte con valor diagnóstico y el control positivo alto deberá tener un valor de DO superior en 4 veces al nivel diagnóstico y servirá para controlar la amplitud del sistema.

Cut off (Punto de Corte o PC.): PC= $\overline{X}$ + 3 Desv. Estándar

$$\textbf{DESV. EST.} = \sqrt{\frac{\sum X^2 - (\sum X)^2 / n}{n-1}}$$

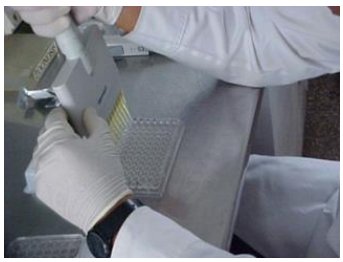
Sensibilidad y Especificidad de la técnica o prueba de ELISA

S= $\frac{14}{14+0}$ x 100 = 100% **E**= $\frac{309}{52 + 309}$ x 100 = 85.6%

ANEXO 3

MÉTODOS INMUNOSEROLÓGICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA CISTICERCOSIS HUMANA

I.- Técnica de ELISA (Enzime Linked Inmunosorbent Assay)



Procesando ELISA



Lavador de placas ELISA



Lector ELISA

Fig. 6-A.- Equipos para la prueba de ELISA

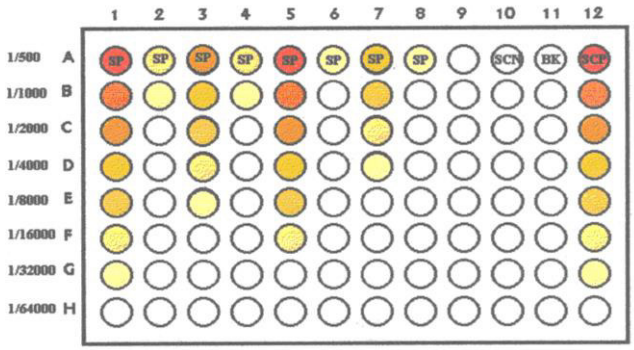


Fig. 7: Lectura de la prueba de ELISA (Esquemática)

- Controles Positivos: A12, B12, C12, D12, etc. (Naranja a Amarillo)
- Controles Negativos: A10, B10, C10, D10, etc. (Incoloro)
- Blanco: A11, B11, C11, D11, etc. (Incoloro)
- Reacción Positiva: A1, A3, A5, A7 (Naranja a Amarillo)
- Reacción Negativa: A2, A4, A6, A8 (Incoloro)

Ensayo inmunoabsorción ligado a enzimas en nitrocelulosa (NCM-ELISA)

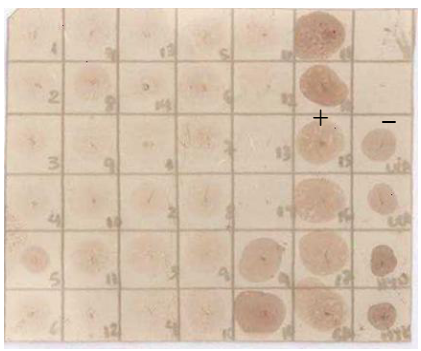


Figura N° 8: NCM-ELISA del Ag.LVC. semi purificado (UCAY, HCYO)

ELISA

Reactivos y soluciones

Tris-HCl 0.01M, pH 7.5 (preparación del Ag.LVC)

Trisma-HCI anhidro	1.270 gr.
Trisma base anhidro	0.236 gr.
H_2O dest., para pH 7.5	1000 mL.

Solución Buffer fosfato salino o sol. para lavado (PBS O.1M pH 7.2)

Preparar las siguientes soluciones:

a-	Na_2HPO_4. 12 H_2O 0.1M	3.58 gr/100 mL.
b-	NaH_2PO_4. 1 H_2O 0.1 M	1.38 gr/100 mL.

Pesar:

NaCl	8.76 gr.

Mezclar 122 mL de **a** + 28 mL de **b** + 8.76 gr. de NaCl.

Adicionar Agua dest. hasta un volumen cercano a 1 Lt., ajustar el pH con la solución **a** o **b.** Conservar a 4°C.

Buffer de lavado (PBS-Tween$_{20}$)

PBS 0.1M pH 7.2	100 mL.
Tween$_{20}$	50 µL.

Solución bloqueadora

PBS 0.1M pH 7.2	100 mL.
Tween$_{20}$	50 µL.
Suero Albúmina de Bovino (BSA)	1 gr.

Dilución del conjugado

PBS-Tween$_{20}$	4.90 mL
Conj. Anti IgG-Humano-Peroxidasa	10.0 µL.

- Realizar la dilución antes de usarla. Para una placa (96 pocillos)

Solución Buffer citrato para sustrato OPD - H_20_2 (OPD-Polvo)

Preparar las siguientes soluciones:

a-	Ácido Cítrico 0.1M	1.921 gr/100 mL
b-	Citrato de Sodio 0.1M	2.941 gr/100 mL

* Conservar a 4°C. Para cada placa mezclar 5mL de **a** + 5mL de **b**

Sustrato OPD-Polvo

0 - Phenilenediamine (OPD)	4 mg

Buffer Citrato	10 mL. (Ac.Cítrico. 5mL.y Cit.Na. 5mL.)
Peróxido de Hidrógeno (H_20_2 30%)	10 µL.

* Preparar la solución del sustrato antes de usarlo. Emplear guantes y mascarilla para pesar y manipular la solución.

Solución Buffer fosfato citrato 0.05M; pH 5.0 (para sustrato OPD-Tableta)

Fosfato Dibásico de Na. 0.2M	25.7mL.
Ácido Cítrico 0.1M	24.3mL
H_2O Desioniz. o tridest	50.0mL

- Ajustar a pH 5.0

Sustrato OPD-Tableta

OPD-Tab. (1 Tab.)	5.0mg.
Buffer Fosfato Cit.	12.5mL
H_2O_2 30%	5.0 µL

	OPD-Polvo	**OPD-Tableta**
Ácido sulfúrico (H_2SO_4)	**2M**	**3M**
Ácido Sulfúrico	2 mL	3 mL
H_2O destilada	8 mL	7 mL

* Agregar el ácido al agua. Emplear guantes, mascarilla y pipetear el ácido con bulbo de goma.

II.- Técnica de Inmunoblot (IB)

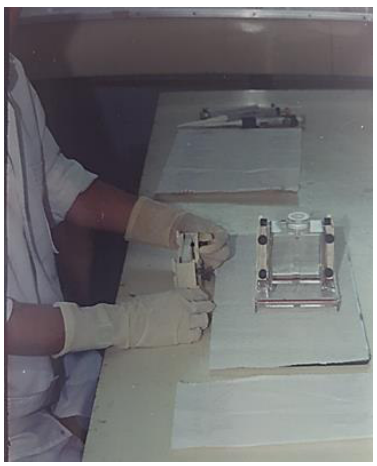


Fig. 9.- Preparación del gel (Sup. – Inf.)

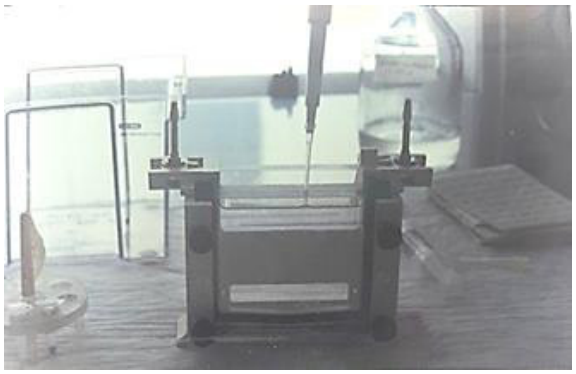


Fig. 10.- Preparación de la electroforesis

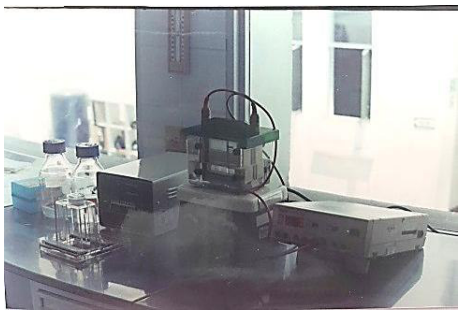
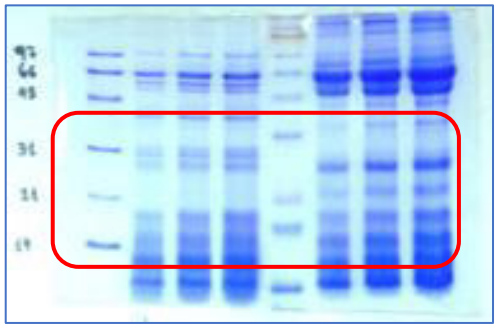


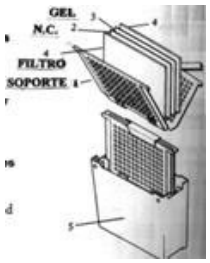
Fig. 11.- Corrida electroforética



Electroforesis en gel de Poliacrilamida: Se realzó el control del Ag. Se verificó presencia de bandas diagnósticas entre 13 a 35 KDa.

Fig. 12: Perfil proteico del Ag.LVC-mix semipurificado en gel de poliacrilamida





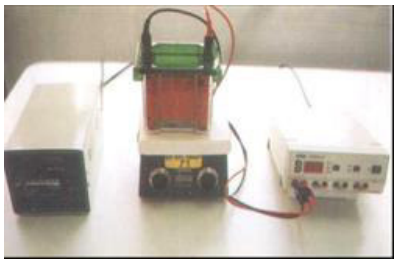


Fig. 13.- Preparación y Transferencia de proteínas del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa (montaje y sándwich).

INMUNOBLOT

Reactivos y soluciones para separación de proteínas (SDS-Page)

Buffer Tris-HCI 0.05M, pH 8.0 (Preparación Ag.LVC. Liofilizado)

	1M	**0.01M**	**0.05M**
Tris o Trizma base	12.11 g	0.1211 g	0.6055 g
NaCl	5.8 g	0.058 g	0.290 g
H_2O desionizada c.s. p.	100 mL	100 mL	100 mL

Ajustar a pH 8.0 con HCI conc. (aprox. 0.5 µL).

Solución Buffer de tratamiento del Ag.LVC o Buffer de muestra (sample) 4X

Tris o trizma base 0.05M, pH 6.8	1.0mL	2.5mL	0.125 M conc.final
Dodecil Sulfato Sodio (SDS)10%	1.6mL	2.5mL	2.5%
2-Mercapto etanol*	0.4mL	2.5mL	25%
Glicerol	0.8mL	2.5mL	25%
Azul de Bromofenol (w/v)	0.2mL	1.0 mg	0.1 mg/mL

* Manipular con guantes y mascarilla.

Diluir la muestra (Ag.) 1/4 (3 Ag. ---------- 1 Buffer Mo.)

Hervir por 5 mins.(baño María) y depositar en los pocillos del gel, según esquema.

Sol. stock de poliacrilamida de resolución (Acril/Bis : 30% / 2.67%)

Acrilamida	14.6 gr.
N,N Metilen bis acrilamida	0.4 gr.
H_2O desionizada o tridest.	50 mL*

* Utilizar guantes y mascarilla. Agregar 25 mL agua caliente, esperar que enfríe y completar el volumen. Filtrar con papel filtro 0.2µm, en tubo de plástico, proteger con papel metálico y conservar a 4°C (refrigerar).

Buffer de separación - Gel inferior (Tris 1.5M pH 8.8)

Tris o trizma base	18.165 gr.
H_2O desionizada o tridest. csp.	100 mL*

* Agregar 75 mL de agua y ajustar a pH 8.8 con HCI conc., luego completar a 100 mL

Guardar a 4°C (refrigerar).

Solución dodecil sulfato de sodio (SDS) AL 10%

SDS	10 gr.	5 gr.
H_2O desionizada o tridest. csp.	100 mL	50 mL.

Conservar a 4°C (refrigerar) o a T°A.

Solución persulfato de amonio (APS) AL 10%

APS	10 gr.	0.5 gr.
H_2O desionizada o tridest. csp.	100 mL	5.0 mL

Alicuotar, proteger con papel metálico y conservar a -20°C Usar guantes y mascarilla.

Temed

Alicuotar el Temed, proteger con papel metálico, conservar a 4°C (refrigerar, trabajar en cámara de flujo laminar), utilizar mascarilla y guantes.

Buffer de empaquetamiento - Gel superior (Tris 0.5 M pH 6.8)

Tris o trizma base	6.055 gr.
H_2O desionizada o tridest. csp.	100 mL.

* Agregar 75 mL. de agua y ajustar a pH 6.8 con HCI conc. luego completar a 100 mL.

Guardar a 4°C (refrigerar).

Tampón o buffer de corrida - electroforesis (10X)

Tris o trizma base (0.25M)	3.038	gr.
Glicina (2M)	15.014	gr.
SDS (1%)	1.0	gr.
H_2O des ionizada o tridest. csp.	100	mL

Almacenar a 4°C (refrigerar)

Preparar antes de usar (1mL. Buffer 10X ---------- 9 mL de agua).

Tabla N° 5: Fórmula de concentración del gel de Empaquetamiento (5%) y gel de Separación (12% y 15%)

INSUMO	GEL EMPAQUETO. (SUP.)	GEL SEPARACIÓN (INF.)	
	5%	12%	15%
Agua des ionizada	2.27 mL	3.3 mL	2.3 mL
Stock Acrilamida (acril./bisacril. 30%)	0.66 mL	4.0 mL	5.0 mL
Buffer gel Inf. o de separación	-----	2.5 mL	2.5 Ml
Buffer gel Sup. o empaquetamiento	1.0 mL	----	----
SDS 10%	40.0 µL.	100 µL.	100 µL.
Persulfato de amonio-APS	20.0 µL.	50 µL.	50 µL.
Temed	4.0 µL.	5 µL.	5 µL.

* Agregar agua tridest. y/o agregar unos 100 µL. agua saturada de butanol, butanol y agua tridest. (v/v), homogenizar y agregar la porción superior sobre el gel inferior.

Reactivos y soluciones para la transferencia

Buffer de transferencia

Tris o Trizma base (20 mM) 2.4 gr.

Glicina (150 mM) 11.25gr.

SDS 1gr.

Metanol (20%) 200mL.

H_2O desionizada o tridest. csp. 1000mL.

- Almacenar a 4°C.

Solución Buffer fosfato salino (PBS 0.01M, pH 7.2)

Preparar dos soluciones como sigue:

A. NaH_2PO_4. H_2O (0.01M) 1.3799gr.

NaCl (0.15M) 8.766 gr.

H_2O desionizada o tridest. csp.1000

B. $Na_2HPO_4.7H_20$ (0.01M) 2.6807gr.

NaCl (0.15M) 8.766 gr.

H_2O desionizada o tridest. csp. 1000mL.

* Mezclar las soluciones A y B (aprox.2 partes de A y 6 partes de B) Ajustar pH a 7.2

Reactivos y soluciones para reacción inmuno enzimática - Al momento:

Buffer de lavado (PBS-T_{20})	**1 placa**
PBS 0.01M pH 7.2	100 mL.
$Tween_{20}$	0.3 mL.

Solución de bloqueo (PBS-TL)		**1 placa**
PBS-T_{20}	100 mL.	25 mL.
Leche descremada	5 gr.	1.250gr.

Suero control negativo (SCN), Positivo (SCP) y suero problema (S. Prob.) diluidos a 1/100 en PBS-TL.

Conjugado Anti-IgG Humano con peroxidasa diluido a 1/500 o 1/1000 en PBS-TL según titulación.

Solución reveladora (Substrato peroxidasa)

1) 3.3'diaminobenzidina tetraclorhidrato (DAB 5 mg)	**2) DAB conc. (DAB 10X)**
PBS 0.01M pH 7.2 …….. 10 mL	DAB ……..... 50 mg
H_20_2 (30%) ……. 10 µL	PBS 0.01M, pH7.2 …10 mL

* Alicuotar y almacenar a -4°C (congelación) hasta su uso : Diluir 1 mL de DAB 10X con 9 mL. de PBS 0.01M, pH7.2, luego agregar 10 µL. de H_20_2 (30%).

ANEXO 4

VALORES PREDICTIVOS

Tabla 6. Sensibilidad y Especificidad, VPP y VPN de las técnicas ELISA e IB utilizando Ag. LVC. *T. solium* semi purificado.

Técnica	Antígeno semipurificado	Sensibilidad (S)	Especificidad (E)	Valor Predictivo Positivo (VPP)	Valor Predictivo Negativo (VPN)
Ensayo inmunoenzimático (ELISA)	LVC	100,0%	85,6%	21,2%	100,0%
Inmunoblot (IB)	LVC	95,0%	100,0%	100,0%	98,1%

Interpretación:

Los valores predictivos miden la eficacia real de una prueba diagnóstica. Son probabilidades del resultado, es decir, dan la probabilidad de padecer o no una enfermedad (cisticercosis) una vez conocido el resultado de la prueba diagnóstica.

Tabla 7. Datos específicos de S, E, VPP y VPN para ELISA e Inmunoblot (IB)

PRUEBA		Cisticercosis (+)	Cisticercosis (-)	TOTAL	Valor Predictivo	Eficiencia
ELISA	(+)	14 VP	52 FP	66 Positivos	Valor Predictivo Positivo **VPP = 21,2%**	Eficiencia diagnóstica 86,1%
	(-)	0 FN	309 VN	309 Negativos	Valor Predictivo Negativo **VPN = 100%**	
Total		14	361	375		
S y E		**S = 100%**	**E = 85,6%**			

PRUEBA		Cisticercosis (+)	Cisticercosis (-)	Total	Valor Predictivo	Eficiencia
IB	(+)	14 VP	0 FP	14 Positivos	Valor Predictivo Positivo **VPP = 100,0%**	Eficiencia diagnóstica 98,5%
	(-)	1 FN	51 VN	52 Negativos	Valor Predictivo Negativo **VPN = 98,1%**	
Total		15	51	66		
S y E		**S = 93,5%**	**E = 100,0%**			

ANEXO 5

Glosario o definición de términos

Cisticerco: Parásito, fase larvaria de *Taenia solium*, por ingerir huevos en heces del teniásico y se encuentran en los alimentos contaminados. Si afecta el sistema nervioso central produce la neurocisticercosis [23].

Cisticercosis : Es una zoonosis parasitaria producida por la larva o cisticerco de la *Taenia,* con dos formas de desarrollo: tenia o adulto y cisticerco o larva. (ver Fig.1)

La Tenia o adulto, desarrolla en el intestino delgado del hombre y,

El Cisticerco o larva, que principalmente se encuentra en el tejido muscular del cerdo.

***Taenia solium o adulto*:** Presenta un cuerpo aplanado y acintado, pudiendo alcanzar 8 metros de longitud. Se le distingue tres porciones: cabeza, cuello y cuerpo o estróbila. La estróbila está formada por la sucesión de proglótides o anillos, los mismos que se forman a partir del cuello y son inmaduros, maduros y grávidos.

El parásito adulto es hermafrodita, el sistema excretor constituido por canales que se localizan lateral y longitudinalmente, están en contacto con el exterior. Los poros genitales de cada proglótide están ubicados en el borde lateral y a una altura media (ver Fig.1).

Antígeno: Para el estudio utilizaremos el Ag. de Líquido Vesicular de Cisticerco total y las Fracciones antigénicas aisladas.

Electroforesis: La electroforesis es un método de separación de proteínas mediante la aplicación de un campo eléctrico [39].

Técnica ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas) es una técnica de ensayo inmunoenzimático en la cual el antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo adherido a una enzima y generar un producto colorimétrico detectable (densidad óptica) [39]**.**

Técnica Immunoblotting o Western blot o Westernblotting: IB o inmunoblot o electro inmuno transferencia (EITB), es una técnica para detectar una proteína específica empleando anticuerpos [39].

Fracciones antigénicas: Porción de proteína antigénica de determinado peso molecular (PM) en KiloDaltons (KDa), obtenidos por separación cromatográfica, permite purificar un antígeno total [39]**.**

Sensibilidad (S): Es la probabilidad correcta de catalogar a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad que un sujeto enfermo en la prueba obtenga un resultado positivo.

La sensibilidad también se puede definir como la capacidad de la prueba para detectar la enfermedad en el paciente y se conoce como "fracción de verdaderos positivos" (FVP), Fernández y Díaz (2003), citado por Ferrer E. [45].

S= Número de pacientes positivos serológicamente/ Número total de pacientes con enfermedad comprobada.

Especificidad (E): Es la probabilidad correcta de catalogar a un individuo sano, es decir, la probabilidad que un sujeto sano en la prueba obtenga un resultado negativo o normal. La especificidad se puede definir como la capacidad de la prueba para detectar a los pacientes sanos y se denomina "fracción de verdaderos negativos (FVN)" [45].

E= Número de pacientes negativos serológicamente/ N° total de pacientes sanos.

NCC o Neurocisticercosis: Se denomina así a la ubicación del o los cisticercos de *T. solium* en el sistema nervioso, ya sea en el cerebro o médula espinal (García, Gonzales, Evans & Gilman) **[54]**. Es la forma clínica más importante, pues la sintomatología es variada y el diagnóstico requiere de pruebas de laboratorio (ELISA, Inmunoblot, etc.) y de estudios por imágenes del cerebro (Tomografía axial computarizada o TAC y resonancia magnética).

Según Del Brutto (2017) **[32]** la sintomatología puede ser neurológica y/o psíquica, desde cefalea como único síntoma, hasta convulsiones tipo epilepsia, parálisis de pares craneales, hemiplejia, alteraciones visuales, entre otros, en muchos casos con sintomatología de masa expansiva intracerebral.

El diagnóstico de laboratorio puede mostrar líquido céfalo raquídeo (LCR) alterado, aumento de la presión, aumento de la cantidad de proteínas, aumento de células en el sedimento y a veces presencia de eosinófilos.

Las pruebas serológicas de ELISA y moleculares (Inmunoblot), las mismas que se pueden realizar con el LCR son las indicadas para el estudio de estos casos.

Coker-Vann et al, obtuvieron el 80% de positividad en suero con antígeno preparado por cromatografía de intercambio iónico. Montenegro, determinó una dilución discriminativa de 1/2500 para el extracto crudo y de 1/500 para el extracto precipitado con sulfato de amonio, otros autores como Nascimento et al, emplearon una dilución discriminativa de 1/256 en la que no se observaron reactividad cruzada con otras parasitosis [20, 21, 48, 49, 50].

En la investigación, con la prueba de ELISA, el punto de corte fue de 0,125 y la dilución discriminativa del suero de paciente fue 1/1000 para el Ag.LVC. *T. solium* semi purificado con sulfato de amonio. De 375 muestras de suero humano procesadas, 66 (17,6%) resultaron ELISA positivos, siendo el título más bajo 1/500 y el título más alto 1/64000. De los sueros ELISA positivos, 14/66 (21,2%) fueron confirmados por IB como positivos y corresponden a ELISA cuyo título es 1/1000.

Desde el punto de vista epidemiológico los métodos de diagnóstico inmunoserológicos (ELISA, Inmumnoblot) son necesarios aun cuando presentan limitaciones en su sensibilidad y especificidad (Dorny *et al.*) [50].

Montenegro en Perú obtuvo una sensibilidad de 82% en suero y 94% en LCR para el extracto crudo (EC) y para el extracto precipitado con sulfato de amonio de 73% en suero y 78% en LCR y obtuvo una especificidad de 76% en suero y 93% en LCR por ELISA. La prueba de ELISA utilizando antígeno extracto total, presenta alta sensibilidad (81%) y tiene baja especificidad (92%), pues genera falsos positivos por las reacciones cruzadas que presenta con *Hidatidosis (Echinococcus granulosus), teniasis* por *Hymenolepis nana*, *Esquistosomiosis, Fascioliasis* [19, 21, 49, 50, 51]**.** Sin embargo, existen pruebas de laboratorio más accesibles y económicas, aunque su sensibilidad y especificidad no sean las mismas [22].

En nuestro estudio serológico de pacientes con sospecha de cisticercosis se demostraron con la prueba de ELISA una alta sensibilidad (100%) y baja especificidad (85,6%), a la dilución 1/1000. ELISA presentó reactividad cruzada con *Hidatidosis, fascioliasis, teniasis* por *Hymenolepis nana* y *esquistosomiasis.*