

Evaluación del cisticerco longicollis de *Taenia crassiceps* como fuente de antígeno para el diagnóstico de la neurocisticercosis

Dr. Jorge Humberto Botero Garcés, Dra. Sonia del Pilar Agudelo López,
Dra. Diana Isabel Gómez Ospina*

Palabras claves: *Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, cisticerco cellulosa, cisticerco longicollis, neurocisticercosis.

Introducción

La cisticercosis del SNC es la infección causada por el estado larvario de *Taenia solium*, se produce por la ingestión de huevos a través de los alimentos o agua contaminada con materia fecal humana, principalmente en áreas con inadecuada eliminación de excretas, insuficiente abastecimiento de agua y malas condiciones higiénicas; es la más importante de las enfermedades neurológicas humanas de origen parasitario, genera una morbilidad considerable y en las áreas donde *T. solium* es endémica, se sabe que es una de las principales causas de epilepsia crónica, que tiene graves consecuencias individuales y sociales.

El diagnóstico de la neurocisticercosis (NCC) está basado en criterios clínicos, epidemiológicos e inmunológicos. Los estudios de neuroimagen como la resonancia magnética (RM) y la tomografía computarizada (TC) son los métodos más sensibles y específicos para el diagnóstico de NCC pero su alto costo y disponibilidad restringida en los países en vía de desarrollo condicionan su uso (2). La determinación de anticuerpos anti-*T. solium* por medio del *immunoblot* es una buena herramienta para el diagnóstico de la NCC, presenta mayor sensibilidad y especificidad

frente a otras metodologías como el *Enzyme-Linked Immunoassay (ELISA)*, tanto en muestras de suero como en muestras de LCR (3,6). Esta prueba permite identificar patrones de polipéptidos antigénicos específicos de especie que posibilitan un diagnóstico de certeza al facilitar la discriminación de otras bandas de glicoproteínas compartidas por otras especies de parásitos filogenéticamente relacionados como el estadio adulto de *Taenia solium* y *Taenia saginata*, *Echinococcus* y *Strongyloides*, además permite la purificación de estas moléculas para su posterior estudio y caracterización (15).

La sensibilidad del *immunoblot* se ha visto afectada por el diseño metodológico, la evolución de la enfermedad y principalmente el tipo de antígeno utilizado. Para evitar estos inconvenientes, algunos grupos de investigadores han realizado un gran esfuerzo por buscar cisticercos de otras *Taenias* que compartan moléculas con *T. solium* y puedan ser utilizados como antígenos heterólogos para las pruebas inmunológicas, por lo que se ha planteado la posibilidad de emplear el cisticerco longicollis de *Taenia crassiceps*. *Taenia crassiceps* es un metacéstodo que infecta de forma natural a los zorros rojos (*Vulpes vulpes*), lobos (*Canis lupus*) y otros pequeños roedores hasta ahora reportados en Europa y Ontario (20), presenta una alta tasa de reproducción, la cual se debe a la propiedad de reproducirse asexualmente por gemación en la zona opuesta al éscolex tanto en la parte externa como en la parte interna del cisticerco, una característica que muy pocos parásitos pueden desarrollar (4).

* Grupo Interdisciplinario para el Estudio de las Parasitosis Intestinales GIEPI. Corporación de Patologías Tropicales, Universidad de Antioquia.

Cuando se realizan infecciones orales experimentales de hospederos intermediarios incluyendo al ratón, los huevos ingeridos se desarrollan como metacístodos en la fascia, el tejido muscular, el tejido peritoneal, el riñón, el pericardio, etc, mientras que cuando se realizan infecciones por inoculación intraperitoneal, los cisticercos se quedan confinados en la cavidad abdominal (4).

Algunos estudios comparativos entre cisticercos *longicollis* y cisticercos *cellulosae* han demostrado que los antígenos de *T. crassiceps* pueden ser tan sensibles y específicos como los de *T. solium* (1,9-12). García y colaboradores sugieren que el antígeno obtenido de *T. solium* puede ser sustituido por el antígeno obtenido de *T. crassiceps* pues además de reaccionar cruzadamente con los péptidos de *c. cellulosa* en las pruebas inmunológicas y de obtenerse una muy buena reproducibilidad, ofrece varias ventajas por cuanto puede ser fácilmente mantenido en animales de laboratorio, lo que representa la producción de grandes cantidades de antígeno obtenido en condiciones que garantizan la homogeneidad y la calidad del mismo, en contraste con las serias dificultades técnicas y económicas que se presentan al obtener antígeno de *T. solium* (5,7,13,16).

Objetivos

General:

Evaluar el uso de cisticercos *longicollis* de *Taenia crassiceps* como antígeno de elección para el diagnóstico serológico de la neurocisticercosis.

Específicos:

- Obtener extractos proteicos crudos y semipurificados del líquido vesicular y del metacístodo total de *cisticercos cellulosa* y *cisticercos longicollis*.
- Comparar los patrones electroforéticos de los preparados antígenicos de *cisticercos cellulosa* y *cisticercos longicollis*.
- Identificar los diferentes polipéptidos reconocidos por los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes con NCC con cada extracto antígeno.
- Detectar fracciones polipeptídicas de los extractos proteicos de *cisticercos cellulosa* y *cisticercos longicollis* que sean específicas y sensibles para establecer un diagnóstico eficaz de NCC humana.

Metodología propuesta

Tipo de estudio:

Experimental enmarcado tanto en un conocimiento básico como también aplicado.

Obtención de los cisticercos y preparación del antígeno crudo total y vesicular

Los cisticercos de *T. solium* serán extirpados del músculo de los cerdos naturalmente infectados y los cisticercos de *T. crassiceps* serán recobrados de la

cavidad abdominal de ratones BALB/c inoculados intraperitonealmente. Se lavarán en tampón de fosfatos que contiene antibióticos y serán congelados hasta su uso. Para ambas especies se tomarán 20 G de quistes intactos y se descongelarán por inmersión, resuspendidos en 2.5 volúmenes de tampón de homogenización con inhibidores de proteasas y sonicados en baño de hielo, se centrifugará y se recuperará el sobrenadante. El antígeno crudo del líquido vesicular se obtendrá por lisis mecánica de los quistes y centrifugación a 15.000 G por 60 minutos. El sobrenadante se sonificará a 20 kHz, y se centrifugará a 10.000 G durante 20 minutos, se adicionarán inhibidores de proteasas y se congelará hasta su uso.

Semipurificación de las glicoproteínas

El antígeno crudo se fraccionará en una columna de sefarsa-L *culinaria*-4B, 3 veces. La columna será lavada con PBS y las glicoproteínas unidas serán eluidas con α -metil-manósido. Posteriormente se dializará y concentrará por ultracentrifugación. Las proteínas serán cuantificadas por el método de Bradford.

Sueros controles

Como controles positivos se utilizarán 30 muestras de pacientes con diagnóstico definitivo de NCC, estos sueros se encuentran crioconservados en el banco de sueros del GIEPI. Como control negativo se emplearán 30 muestras de individuos sanos sin sintomatología de NCC, ni infección con *T. solium* o *T. saginata* y serología negativa para NCC. Estos sueros serán recolectados previo consentimiento informado. También se correrán 50 muestras de suero de pacientes con otras helmintosis como teniosis, hymenolepiasis, strongyloidosis y otras infecciones neurológicas como meningitis bacteriana, malaria cerebral y toxoplasmosis.

Electroforesis e inmunoblot

Cada extracto diluidos en tampón de muestra será separado electroforéticamente en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), luego transferido a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 mm utilizando el mini trans blot (8,14). Terminada la transferencia, las membranas se bloquearán con tampón tris salino más leche al 5% (TS-L5%) una hora a 37° C y se lavarán con tris salino (TS) 20 mM durante 10 minutos en agitación. La reacción con el suero diluido 1:100 en TS-L1% se realizará en tiras de nitrocelulosa de 3 mm durante 1 1/2 hora, se agregará el segundo anticuerpo unido a peroxidasa y se revelará con diaminobenzidina.

La determinación del peso molecular de las bandas se hará extrapolando los datos en una curva semilogarítmica previamente elaborada.

Análisis de los resultados

Para cada uno de los preparados antigénicos se determinará la sensibilidad y la especificidad, el valor predictivo positivo y negativo, especificando su respectivo intervalo de confianza. Los resultados serán analizados en el programa estadístico EPIDAT donde aplicaremos Chi-cuadrado.

Referencias Bibliográficas

- (1) Bueno, E. C., A. J. Vaz, L. D. Machado, J. A. Livramento, and S. R. Mielle. 2000. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. *J Clin Microbiol* 38:146-51
- (2) Del Brutto, O. H., V. Rajshekhar, A. C. White, Jr., V. C. Tsang, T. E. Nash, O. M. Takayanagui, P. M. Schantz, C. A. Evans, A. Flisser, D. Correa, D. Botero, J. C. Allan, E. Sarti, A. E. Gonzalez, R. H. Gilman, and H. H. Garcia. 2001. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurology* 57:177-83.
- (3) Diaz, J. F., M. Verastegui, R. H. Gilman, V. C. Tsang, J. B. Pilcher, C. Gallo, H. H. Garcia, P. Torres, T. Montenegro, and E. Miranda. 1992. Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*): a field comparison of an antibody-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), an antigen-ELISA, and an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay in Peru. The Cysticercosis Working Group in Peru (CWG). *Am J Trop Med Hyg* 46:610-5.
- (4) Freeman, R. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810. *Canadian Journal of Zoology* 40:969-990.
- (5) Garcia, E., G. Ordonez, and J. Sotelo. 1995. Antigens from *Taenia crassiceps* cysticerci used in complement fixation, enzyme-linked immunosorbent assay, and western blot (immunoblot) for diagnosis of neurocysticercosis. *J Clin Microbiol* 33:3324-5.
- (6) Gottstein, B., D. Zini, and P. M. Schantz. 1987. Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. *Trop Med Parasitol* 38:299-303.
- (7) Katti, M. K. 2000. Are alternative sources of parasitic (cysticercal) antigens necessary for diagnosis of neurocysticercosis? *J Clin Microbiol* 38:3524-5.
- (8) Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- (9) Larralde, C., R. M. Montoya, E. Sciutto, M. L. Diaz, T. Govezensky, and E. Coltorti. 1989. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am J Trop Med Hyg* 40:282-90.
- (10) Larralde, C., J. Sotelo, R. M. Montoya, G. Palencia, A. Padilla, T. Govezensky, M. L. Diaz, and E. Sciutto. 1990. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch Pathol Lab Med* 114:926-8.
- (11) Pardini, A. X., R. H. Peralta, A. J. Vaz, R. Machado Ldos, and J. M. Peralta. 2002. Use of *Taenia crassiceps* cysticercus antigen preparations for detection of antibodies in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis (*Taenia solium*). *Clin Diagn Lab Immunol* 9:190-3.
- (12) Peralta, R.H., A.J. Vaz, A. Pardini, H. W. Macedo, L.R. Machado, S. G. De Simone, and J. M. Peralta. 2002. Evaluation of an antigen from *Taenia crassiceps* cysticercus for the serodiagnosis of neurocysticercosis. *Acta Trop* 83:159-68.
- (13) Pinto, P. S., A. J. Vaz, P. M. Germano, and P. M. Nakamura. 2000. ELISA test for the diagnosis of cysticercosis in pigs using antigens of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 42:71-9.
- (14) Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4.
- (15) Tsang, V. C., J. A. Brand, and A. E. Boyer. 1989. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis* 159:50-9.
- (16) Vaz, A. J., C. M. Nunes, R. M. Piazza, J. A. Livramento, M. V. Da Silva, P. M. Nakamura, and A. W. Ferreira. 1997. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am J Trop Med Hyg* 57:354-7.