

## **Nuevas fracciones antigénicas para el inmuno-diagnóstico de la neurocisticercosis.**

### **New antigenic fractions for neurocysticercosis diagnosis.**

**Rivas, I.<sup>1</sup>; Rossi, N.<sup>2</sup>; Hernández, M.<sup>3</sup> y Urdaneta, H.<sup>4</sup>**

1. Médico internista. Laboratorio de Inmunoparasitología. Instituto de Inmunología Clínica. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes. Correspondencia: Dra. Haideé Urdaneta. Instituto de Inmunología Clínica. Facultad de Medicina. ULA. Apartado Postal 566. Mérida 5101. Venezuela. Telf. 403199. Fax.

2. Master en Inmunología. Laboratorio de Inmunoparasitología.

3. Doctor en Inmunología. Director del Instituto de Inmunología Clínica.

4. Doctora en Ciencias. Coordinadora de la División de Investigación del Instituto de Inmunología Clínica y Jefe del Laboratorio de Inmunoparasitología. Instituto de Inmunología Clínica. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes.

### **RESUMEN**

La neurocisticercosis (NCC) es la enfermedad parasitaria más frecuente del sistema nervioso central causada por la forma larvaria enquistada de la *Taenia solium*, su diagnóstico se basa en la integración de datos clínicos, imagenológicos y serológicos. La detección de anticuerpos específicos usando el ensayo inmunoenzimático (ELISA) es una útil estrategia para confirmar el diagnóstico de la NCC. Estudios previos demuestran que la *Taenia crassiceps* y la *Taenia solium* tienen similitud estructural y antigénica; en este trabajo evaluamos antígenos de ambos parásitos frente a 68 líquidos cefalorraquídeos y 40 sueros pertenecientes a casos confirmados de NCC y a controles. Para cumplir tal objetivo enfrentamos en ELISA las muestras de los pacientes contra cada uno de tres extractos antigénicos de cada tenideo: el fluido vesicular, la

## NUEVAS FRACCIONES ANTIGÉNICAS PA

membrana externa y el extracto total. El análisis estadístico demostró una alta sensibilidad y especificidad de los antígenos de la *T. crassiceps*, especialmente el fluido vesicular; el cual dio una sensibilidad de 90,3%, una especificidad de 94,5% y valores predictivos positivos y negativos de 93,3% y 92,1% frente a los LCR. Estos atributos hacen de esta fracción parasitaria una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico de la NCC, pudiendo sustituir los antígenos procedentes de carcasas de cerdos infectados naturalmente con *T. solium*.

**Palabras claves:** Cisticercosis, neurocisticercosis, *T. solium*, *T. crassiceps*, inmunodiagnóstico, ELISA.

### SUMMARY

Neurocysticercosis (NC) a tapeworm (*Taenia solium*) infection, is the most common parasitic disease affecting the central nervous system. NC clinical manifestations are secondary to individual response against the parasite. The specific antibody detection using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) is a helpful strategy to confirm the diagnosis of NC. It has been previously reported that there is a high structural and antigenic homology between *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* species, therefore *Taenia crassiceps*, a more feasible organism to maintain in appropriate laboratory conditions, may substitute *Taenia solium* as an antigen provider. We analyzed 40 serum samples and 68 (CSF) cerebrum spinal fluid samples from patients with neurocysticercosis and other neurological diseases negative for NC. ELISA was employed for the diagnosis using three different antigens from each *Taenia*: vesicular fluid, membrane and crude extract. The statistical analysis showed that *T. crassiceps* antigens specially the vesicular fluid have high sensitivity and specificity for NC immunodiagnosis both in serum and CSF samples. The high sensitivity, specificity and positive predictive value (90.3%, 94.5% and 93.3%) in CSF of the above antigen indicate its value to confirm the diagnosis.

**Keywords:** Cysticercosis, neurocysticercosis, *T. solium*, *T. crassiceps*, ELISA.

### INTRODUCCIÓN

La neurocisticercosis (NCC) es la enfermedad parasitaria más frecuente del sistema nervioso central; esta enfermedad afecta a miles de individuos en

## NUEVAS FRACCIONES ANTIGÉNICAS PA

países de América Latina, sudeste de Asia, África y naciones desarrolladas con alta afluencia de inmigrantes procedentes de zonas endémicas.<sup>25</sup> Su expresión clínica es polimórfica; desde asintomática hasta incapacitante y en ocasiones hasta mortal.<sup>24</sup> Afecta seriamente la salud del humano y es responsable de importantes pérdidas económicas en la producción de cerdos en países en vías de desarrollo.<sup>15,31</sup> El agente etiológico es el *Cysticercus cellulosae* que es la forma larval de la *Taenia solium*, céstode que presenta un ciclo biológico complejo.

Por tratarse de una enfermedad con un amplio pleomorfismo, con manifestaciones muy variadas,<sup>4,8,24</sup> el diagnóstico clínico, particularmente a nivel cerebral, resulta complicado. Es necesario recurrir a métodos imagenológicos dentro de los que se destacan la tomografía axial computada,<sup>2,6,27</sup> la resonancia magnética,<sup>16,24</sup> y las pruebas inmunológicas.<sup>1,32</sup> El diagnóstico radiológico es auxiliar del clínico, pero tiene la limitante de que las lesiones parasitarias no siempre son evidenciadas y sólo las calcificaciones son detectadas por los rayos X.<sup>23</sup> Entre las pruebas imagenológicas, la resonancia magnética es la técnica de elección por ser la más sensible, pero con frecuencia, la más utilizada es la tomografía axial computada (TAC) (2) y el análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR), éstos dependen de la fase evolutiva del parásito.<sup>24,28,33</sup>

Las técnicas inmunodiagnósticas para la detección de anticuerpos no son concluyentes para el diagnóstico de la NCC, pero sí constituyen importantes herramientas y en la mayoría de los casos se correlacionan muy bien con los hallazgos tomográficos.<sup>6</sup> Ellas utilizan, en general, mezclas de antígenos con gran complejidad y con variadas propiedades inmunológicas, "por eso, frecuentemente se generan resultados falsos positivos y falsos negativos." El ensayo inmunoenzimático (ELISA), ampliamente utilizado para el diagnóstico de varias enfermedades parasitarias, es un método simple, económico, reproducible, que permite evaluar numerosas muestras a la vez y utilizar fracciones totales o muy purificadas de antígenos.<sup>5,14,17,19</sup>

La eficacia del ELISA en el diagnóstico de la NCC, al igual que otros métodos inmunológicos, depende de varios factores: del antígeno utilizado, del procedimiento empleado y del curso de la enfermedad.<sup>5,20</sup>

El complejo mosaico antigénico del cisticerco, ha estimulado a muchos

## NUEVAS FRACCIONES ANTIGÉNICAS PA

investigadores a realizar estudios dirigidos a encontrar antígenos más sensibles y específicos para el diagnóstico.<sup>9,26</sup> La *T. crassiceps* representa un modelo murino de cisticercosis semejante a la humana, que tiene la ventaja de obtenerse con bastante facilidad por su multiplicación rápida en la cavidad peritoneal de ratones.<sup>30</sup> Recientes estudios han demostrado que *T. solium* y *T. crassiceps* comparten fracciones antigénicas<sup>3,10,30</sup> por lo que se plantea la posibilidad de sustituir los antígenos de *T. solium*, obtenidos de cerdos naturalmente infectados, por los de *T. crassiceps*, que son obtenidos en condiciones controladas en el laboratorio.

Una de las grandes dificultades en el diagnóstico inmunológico en las infecciones parasitarias en general es la compleja naturaleza de sus antígenos, por eso en este trabajo procedimos a estudiar varias preparaciones antigénicas del *C. cellulosae* y de la *T. crassiceps* y para evaluar su sensibilidad y especificidad en el inmunodiagnóstico de la NCC humana en suero y en líquido cefalorraquídeo por medio del ELISA.

### **Material y Métodos**

#### **Pacientes**

Pacientes con diagnóstico confirmado de neurocisticercosis y controles que acuden a la consulta del Hospital Universitario de la Universidad de Los Andes (H.U.L.A.) a los que se tomó muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) y suero con fines diagnósticos.

Se obtuvo un total de sesenta y ocho (68) muestras de LCR mediante punción lumbar y cuarenta (40) sueros por punción venosa periférica, a pacientes casos y controles del Servicio de Neurología del Hospital Universitario.

Se elaboró un formato para la recolección de datos donde se incluyeron datos de identificación del paciente, procedencia, diagnóstico clínico, diagnóstico tomográfico, tipo de muestra y resultados obtenidos del ELISA.

#### **Criterios de inclusión**

Se incluyeron los pacientes con diagnóstico confirmado de neurocisticercosis que tuvieran: clínica compatible con NCC, estudio de neuroimagen (TAC) sugestiva de la enfermedad y anticuerpos.<sup>22</sup>

Pacientes con manifestaciones neurológicas sin hallazgos tomográficos

## NUEVAS FRACCIONES ANTIGÉNICAS PA

sugestivos de NCC, en quienes se realiza una punción lumbar con fines diagnósticos para cualquier otro tipo de patología neurológica.

### **Criterios de exclusión**

Pacientes con NCC en fase inactiva: presencia de granulomas calcificados ubicados a nivel del parénquima cerebral, o sea, aquellos pacientes portadores de quistes que fueron destruidos por las defensas propias del huésped.

Pacientes con NCC en los que se contraindica la realización de una punción lumbar.

### **Antígenos utilizados**

**Antígenos de *C. cellulosae*:** se obtuvieron por disección de los quistes de músculo esquelético de cerdos naturalmente infectados. Después de disecados fueron lavados 5 veces (5x) con buffer fosfato salino 0,15M pH 7.2 (PBS) y luego se procedió a obtener tres fracciones antigénicas: extracto total, fluido vesicular y membrana externa de *C. cellulosae*.

**Extracto total de *C. cellulosae* (ETCC):** los cisticercos completos fueron congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 12 horas, liofilizados, triturados y deslipilizados con etanol absoluto y éter etílico a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 3 veces a intervalos de 3 horas. Luego fueron solubilizados en PBS y fraccionados por ultrasonido (sonicados) tres veces durante un minuto cada vez a 40 hertz, con intervalos de un minuto entre cada sonicada, luego se centrifugaron a 5.000 G por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante fue alicuotado y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Fluido vesicular de *C. cellulosae* (FVCC):** El líquido interior de las vesículas se obtuvo con auxilio de jeringa a temperatura ambiente. El proceso de deslipidización fue el mismo utilizado para la obtención del ETCC. El sedimento fue colocado en un volumen de PBS igual al volumen inicial del líquido, luego se centrifugó a 5.000 G y el sobrenadante denominado FVCC fue alicuotado y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Membrana externa de *C. cellulosae* (MECC):** las membranas se obtuvieron de cisticercos con el auxilio de bisturí, pinza y microscopio estereoscópico. El material fue lavado en PBS pH 7.2 y fraccionado por ultrasonido tres veces, durante un minuto cada vez a 40 hertz, con intervalos de un minuto entre cada sonicada, luego se centrifugaron a 5.000 G por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El

## NUEVAS FRACCIONES ANTIGÉNICAS PA

sobrenadante fue alicuotado y almacenado a -20°C.

**Antígenos de *T. crassiceps*:** estos antígenos fueron producidos a partir de metacéstodes obtenidos del peritoneo de ratones hembra Balb/c de 4-6 semanas de edad, infectados experimentalmente por vía intraperitoneal y los parásitos cosechados entre los 60-90 días postinfección, según el método de Larralde y col (1989), lo obteniéndose tres fracciones antigénicas: extracto total, fluido vesicular y membrana externa de *T. crassiceps*.

**Extracto total de *T. crassiceps* (ETTC):** los metacéstodes íntegros fueron lavados 5x con PBS, resuspendidos en 5 volúmenes de un buffer de sacarosa, hepes, PMSF a pH 7.2 (sacarosa 0,25 M, Hapes - NaOH 0.05, EDTA 2,0 mM y Fenil-metil-sulfonil-fluoride 5mM a una concentración final de 5 mM). La suspensión de los quistes fue sonicada 3 veces, un minuto cada vez a 40 hertz, con intervalos de un minuto entre cada sonicada, luego se centrifugaron a 5.000 G por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue deslipidizado igual que las otras fracciones. El antígeno así preparado (ETCC) fue alicuotado y almacenado a -20°C.

**Fluido vesicular de *T. crassiceps* (FVTC):** los parásitos recolectados se lavaron con PBS pH 7.2 por 3 veces centrifugados a 500 G por 3 min. El sedimento celular se sometió al proceso de ruptura por congelamiento y descongelamiento en nitrógeno y luego se resuspendió en buffer de lisis TRIS HCl pH 7.5 conteniendo inhibidores de proteasas (PMSF y TLCK) 5 mM en frío, se mezcló suavemente y luego se centrifugó a 25.000 G por 60 min. a 4°C. El sobrenadante resultante corresponde al antígeno FVTC, el cual fue alicuotado y almacenado a -20°C.

**Membrana externa de *T. crassiceps* (METC):** las membranas de los metacéstodes fueron retiradas con bisturí y pinza con auxilio de lupa estereoscópica. El material fue lavado en PBS pH 7.2 y fraccionado por ultrasonido por tres veces, luego centrifugado a 5.000 G por 20 minutos a 4°C. Este antígeno (METC) fue alicuotado y almacenado.

### **Ensayo inmunoenzimático ELISA para detección de IgG en suero y LCR:**

Las placas de microtitulación fueron sensibilizadas con los diferentes antígenos (1g por orificio), incubadas por 18 horas a 4°C, bloqueadas por 1 hora con una solución de PBS conteniendo Tween 20 al 0,05% (PBST) y caseína 2%

## NUEVAS FRACCIONES ANTIGÉNICAS PA

(PBST-C), y lavadas 5x con PBST, a cada orificio se agregó 1 OOjal de suero (dilución 1:256) o LCR (dilución 1:4) y se incubó por 1 hora a 37°C, siguiéndose con nuevos lavados 5x con PBST. Se agregó el conjugado anti IgG en diluciones 1:1000, y se incubó por 1 hora. Se realizaron 5x lavados con PBST, se adicionó el sustrato OPD (buffer citrato fosfato 0,14M pH 5, más 0,012% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 0,02% de ortofenilendiamino) y se incubó por 30 minutos al abrigo de la luz, luego, se interrumpió la reacción con 30 µl de ácido sulfúrico 4N.

### **Lectura de las reacciones**

La intensidad de color fue registrada como densidad óptica (DO) en lector automatizado ELISA (Organon Teknica) a 492 nm. Para interpretación de los resultados se tomaron en cuenta los controles positivos y negativos usados en cada placa. Una muestra se consideró positiva cuando presentó 2 desviaciones estándar adicionadas a la media de los controles negativos.

### **Análisis estadísticos**

Los datos obtenidos se evaluaron por medio de métodos estadísticos: análisis de correspondencia múltiple (el paquete estadístico STATITCF), estudio de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos del método en tablas 2x2 y la prueba  $\chi^2$ .<sup>12</sup>

## **RESULTADOS**

### **Análisis de correspondencia de las diferentes fracciones antigénicas para sueros.**

En el gráfico 1, se aprecia la correlación entre casos y controles de la enfermedad frente a las diferentes fracciones antigénicas positivas y negativas de *T. solium* y *T. crassiceps*. Se observa que las fracciones de *T. crassiceps*: FVTC, METC y ETTC fueron las que mejor se correlacionaron con los casos y los controles, entre ellas FVTC.



### **Análisis de correspondencia de las diferentes fracciones antigénicas para líquidos cefalorraquídeos.**

## NUEVAS FRACCIONES ANTIGÉNICAS PA

En el caso de los líquidos cefalorraquídeos (LCR) se observa un comportamiento similar al de los sueros, observándose mayor correlación entre las fracciones antigénicas de la *T. crassiceps* (FVTC y ETTC) tanto para casos como para controles de la enfermedad (Gráfico 2).



### **Sensibilidad y especificidad de los sueros.**

Los resultados obtenidos de sensibilidad y especificidad expresados en porcentajes para los sueros se observan en la tabla 1. Aquí se demuestra que las fracciones de la *T. crassiceps* tienen mayor sensibilidad y especificidad que las de *C. cellulosa* en la detección de anticuerpos en suero de pacientes con NCC. La fracción FVTC presenta la mayor sensibilidad (92,9%) y especificidad (87,5%), con altos niveles de VPP y VPN (86,6% y 93,3%, respectivamente).



### **Sensibilidad y especificidad de los líquidos cefalorraquídeos.**

En la tabla 2 se observan las sensibilidades y especificidades de las fracciones frente a los LCR. En este caso se nota también que el FVTC de *T. crassiceps* conjuga la más alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la NCC.



### **Pruebas de independencia: Chi - cuadrado**

La tabla 3 contiene valores del estadístico Chi - cuadrado y su respectivo valor de significancia (p), para cada una de las fracciones antigénicas, observándose que este valor es menor que 0,01 para las fracciones de *T. crassiceps* y menor que 0,03 para las otras fracciones excepto para la fracción MECC, es decir, que existe correlación estadística significativa entre los pacientes y las fracciones: FVTC, METC, ETTC, FVCC y ETCC.





## NUEVAS FRACCIONES ANTIGÉNICAS PA

### **Prueba de Chi - cuadrado para líquidos cefalorraquídeos.**

Se observa que los valores de significancia ( $p$ ) determinados por el Chi-cuadrado para cada una de las fracciones, excepto la MECC, son menores a 0,02, por lo que se concluye que existe correlación estadística significativa entre los LCR y las fracciones (Tabla 4).



### **DISCUSIÓN**

La alta sensibilidad y especificidad del ELISA en el diagnóstico de la cisticercosis humana lo convierten en un ensayo útil para el diagnóstico o para la confirmación diagnóstica de la NCC en el humano, específicamente a nivel del LCR. Esta técnica presenta problemas de reproducibilidad, reacciones cruzadas y falsos negativos cuando se usan preparaciones antigénicas no purificadas o cuando la fuente de obtención de estos antígenos no es la adecuada.[5](#), [7](#), [18](#)

La *T. crassiceps* como fuente antigénica, constituye una alternativa para el inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis en el humano ya que presenta similitud estructural y antigénica con el *C. cellulosae*,[10](#), [29](#), [32](#) presentando la ventaja de que se obtiene en animales y en condiciones controladas de laboratorio. No existen estudios definitivos que establezcan las variaciones que puedan existir cuando se emplean una u otra fuente antigénica.

En este trabajo se plantea la obtención de antígenos para mejorar el diagnóstico inmunológico de la NCC. Y para ello, obtuvimos tres fracciones antigénicas de la *C. cellulosae* (larva de la *T. solium*) y tres fracciones de *T. crassiceps* y comparamos sus sensibilidades y especificidades en el inmunodiagnóstico. Cada una de estas fracciones se enfrentó tanto a sueros como a LCR obtenidos de pacientes del Servicio de Neurología del HULA. Aunque el suero no constituye, en el momento actual, un elemento diagnóstico seguro para la NCC,[19](#) notamos que se usa frecuentemente en los laboratorios de inmunodiagnóstico, por eso quisimos comparar su comportamiento con el LCR frente a las diversas preparaciones antigénicas que evaluamos.

El análisis de los resultados por medio de tres tipos de evaluaciones estadísticas nos orientó acerca del comportamiento de cada una de las

## NUEVAS FRACCIONES ANTIGÉNICAS PA

fracciones frente a los casos y los controles. Al establecer las correlaciones entre las fracciones se obtuvo una representación gráfica (gráficos 1 y 2) donde se observa que las fracciones obtenidas de la *T. crassiceps* resultan ser las más adecuadas para el diagnóstico de la NCC tanto en suero como en LCR. De estas fracciones el FVTC, en cualquiera de los casos, es la que más se aproximó a la fracción ideal ya que estuvo siempre mejor correlacionada tanto con los casos como con los controles.

El estudio de la sensibilidad y especificidad de cada una de las fracciones antigénicas nos permitió concluir que la mayor sensibilidad y especificidad tanto frente al suero como frente al LCR fue observada con FVTC (Tablas 2 y 3). La mayor sensibilidad expresada por el FVTC en el LCR es relevante debido a la producción local de anticuerpos contra el cisticerco a nivel del sistema nervioso central, es baja en la mayoría de los pacientes que desarrollan NCC activa. En general, la sensibilidad y especificidad obtenidas de las fracciones de *T. crassiceps* fueron mayores a los de *C. cellulosae* (Tablas 2 y 3).

El análisis del Chi-cuadrado para cada una de las fracciones frente a sueros y LCR, nos permitió detectar asociación estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para casi todas las fracciones de *T. crassiceps* y de *C. cellulosae* con respecto a los pacientes (Tablas 4 y 5). Estos resultados se corresponden con los obtenidos tanto en la correspondencia múltiple como en la determinación de la sensibilidad y la especificidad.

Las fracciones obtenidas de la *T. crassiceps*, y en particular el FVTC, resultaron ser útiles para el diagnóstico inmunológico de la NCC, lo que confirma que las larvas de *T. solium* y los antígenos de *T. crassiceps* comparten importantes epítopes." Lo que nos permite concluir que a partir de fracciones de esta última, se pueden obtener antígenos específicos relevantes para el diagnóstico de la NCC.

Al contar con la capacidad de producir antígenos altamente sensibles y específicos y en condiciones controladas de laboratorio, garantizamos mejores procedimientos diagnósticos y avanzamos cada vez más en la comprensión de la respuesta inmunológica contra el cisticerco y sus mecanismos desencadenantes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## NUEVAS FRACCIONES ANTIGÉNICAS PA

1. CHENG, RW, and KO, R.C. 1992. "Purification of larval *Taenia solium* antigens by gel filtration". *Vet. Parasitol.* 43 (1-2): 65-75.
2. CRUZ, ME; PREUX, P.M.; DEBROCK, C; CRUZ, L; SCHANTZ, P.M.; TSANG, V.C. and DUMAS, M. 1999. "Epidemiology of cerebral cysticercosis in an Andean community in Ecuador". *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 92 (1): 38-41.
3. FISCHER, C. and NOSRATIAN, R. 1994. "Preparation and sequence analysis of *Taenia crassiceps* metacestode recombinant antigens with potential for specific immunodiagnosis of human cerebral cysticercosis". *Trop. Med. Parasitol.* 45 (1-2): 324-328.
4. FORLENZA, O.V.; GUERRA, AL.; SMITH, J.P.; MACHADO, L.R.; GARCÍA, N.; PIRES, C.H. and GOUVEIA, M.F. 1997. "Psychiatric manifestations of neurocysticercosis: a study of 38 patients from a neurology clinic in Brazil". *J. Neurology and Psychiatry.* 62: 612-616.
5. GARCÍA, H.H.; HARRISON, L.J.; PARKHOUSE, R.M.; MONTENEGRO, T.; MARTÍNEZ, S.M.; TSANG, V.C. and GILMAN, R.H. 1998. "A specific antigen detection ELISA for the diagnosis of human neurocysticercosis". The Cysticercosis Working Group in Peru. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92 (4): 411-414.
6. GOODMAN, KA.; BALAGH, S.A. and CARPIO, A. 1999. "A case control study of seropositivity for cysticercosis in Cuenca, Ecuador". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60 (1): 70-4.
7. HUBERT, K.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; MICHAULT, A.; FROSCH, M. and MUHLSCHLEGEL, F.A. 1999. "Seriological diagnosis of human cysticercosis by use of recombinant antigens from *Taenia solium* cysticercosis". *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 6 (4) 479-482.
8. KALRA, V. and SETHI, A. 1992. "Childhood neurocysticercosis epidemiology, diagnosis and course". *Acta-Paediatr. Japn.* 34 (3) 365-370.
9. KHAN, N.A. and SOTELO, J. 1991. Immunocytochemical localization of cysticercosis antigen". *Neuroscience Research Communications.* 9 (1): 9-12.
10. LARRALDE, C; MONTOYA, R.M.; SCIUTTO, E; DÍAZ, M.L.; GOVEZENSKY, T; COLTORTI, E. 1989. "Deciphering western blots of tapeworm antigens *T. solium*, *E. granulosus* and *T. crassiceps* reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40: 282-290.

## NUEVAS FRACCIONES ANTIGÉNICAS PA

11. LARRALDE, C.; PADILLA, A.; HERNÁNDEZ, M.; GOVEZENSKY, T.; SCIUTTO, E.; GUTIÉRREZ, G.; TAPIA, R.; SALVATIERRA, B. and SEPÚLVEDA, J. 1991 "Seroepidemiología de la cisticercosis en México". *Salud Pública de México*. 34(2) : 197-210.
12. LILIENFELD, A. 1980. "Foundations of epidemiology". Second edition. Oxford University Press.
13. LOWRY, O.; ROSEBRONGH, N.; FARR, A. and RANDALL, R.J. 1951. "Protein measurement with the folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
14. MALLA, N.; KAUR, U.; GANGULY, N.K. and MAHAJAN, R.C. 1992. "Evaluation of enzyme linked immunoabsorbent assay for the detection of anticysticercus antibodies in cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis". *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 36 (2) 181-190.
15. MANOUTCHARIAN, K.; ROSAS, G.; HERNÁNDEZ, M.; FRAGOSO, G.; ALUJA, A.; VILLALOBOS, N.; RODARTE, J. and SCIUTTO, E. 1996. "Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens". *J. Parasitol.* 82 (2) 250-254.
16. MICHAEL, A.S.; LEVY, J.M. and PAIGE, M.L. 1990. "Cysticercosis mimicking brain neoplasm". MR and CT appearance. *J. Comput. Assist. Tomogr.* 14: 708-711.
17. MOHAMMAD, I.N.; HEINER, D.C.; MILLER, B.L.; GOLDBERG, M.A. and KAGAN, I.G. 1984. "Enzyme linked immunoabsorbent assay for the diagnosis of cerebral cysticercosis". *J. Clin. Microbiol.* 20 (4) 775-9.
18. MOKAROTE, N.; NAWACHAROEN, W.; SUKONTHASUN, K.; THAMMASONTHI, W. and KAMBOON RUANG, C. 1994. "Comparison of cysticercus extract, cyst fluid and *Taenia saginata* extract for use in ELISA for serodiagnosis of neurocysticercosis". *Southeast Asian. J. Trop. Med. Public Health.* 23 (1) 77-81.
19. MONDRAGÓN, A., PLANCARTE, A. and FLISSER, A. 1994. "Diagnosis of human cysticercosis with ELISA". *Salud Pública Mexicana.* 36(4): 393-398.
20. NG, T.F. and KO, R.C. 1994. "Serodiagnosis of cysticercosis: specifically of different antigens and enzyme linked immunoabsorbent assays". *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88:421 -422.
21. PATHAK, K.M.; ALLAN, J.C.; ERSFELD, K. and CRAIG, P.S. 1994. "A western blot and ELISA assay for the diagnosis of *Taenia solium* infection in pigs". *Vet. Parasitol.* 53(3-4): 209-217.

## NUEVAS FRACCIONES ANTIGÉNICAS PA

22. PEÑALOZA, C. y REINOZA, V. 1994, "Consulta de neurocisticercosis. Objetivos, definiciones y pautas. Unidad de Neurología y Neurocirugía". Hospital Universitario de los Andes. Mérida, Venezuela.
23. SANTIN, G. and VARGAS, J. 1966. "Roentgen study of cysticercosis of central nervous system". Radiology. 86: 520-28.
24. SARTI, E. 1997. "La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*". Salud Pública de México. 39 (3): 225-231.
25. SHANKAR, S.K.; RAVI, V; SURYANARAYANA, V.; CHANDRAMUKHI, A. and RAVIKHUMAR, B.V. 1995. "Immunoreactive antigenic sites of *Cysticercus cellulosae* relevant to human CSF as source of antibody". Clin. Neuropathol. 14 (1): 33-36.
26. SIMAC, C; MICHEL, P; ANDRIANTSIMIHAVANDY and ESTREERRE, P. 1995. "Use of immunoabsorbent assay and enzyme immuno-electrotransfer blot for the diagnosis and monitoring of neurocysticercosis". Parasitol. Res. 81: 132-136.
27. SOTELO, J., TORRES, B.; RUBIO, E; ESCOBEDO, F. and RODRÍGUEZ. 1985. "Praziquantel in the treatment of neurocysticercosis: Long term follow-up". Neurol. 35: 752-755.
28. TAKAYANAGUI, O. "Neurocysticercose: Quadro clínico e diagnóstico tomográfico". Resumos 14 Congreso Brasileiro do parasitología. Suplemento da revista de Patología Tropical. 23:102-103.
29. TERRAZAS, L.I.; BOJALIL, R.; GOVEZENSKY, T and LARRALDE, C.A. 1994. "A role for 17-estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*)". J. Parasitol. 80 (4): 563-8.
30. TOLEDO, A.; CRUZ, C; FRAGOSOS, G; LACLETTE, J.R; MERCHANT, T; HERNÁNDEZ, M. and SCIUTTO, E. 1997. "In vitro culture of *Taenia crassiceps* larval cells and cyst regeneration after injection into mice". J. Parasitol. 83 (2): 189-93.
31. TSANG, VC.W. and WILSON M. 1995. "*Taenia solium* cysticercosis: An under recognized but serious public health problem". Parasitology Today. 11: 124-126.
32. VAZ, A.J.; NUNES, C.M.; PIAZZA, R.M.E.; LIVRAMENTO, J.A.; DA SILVA, M.V.; NAKAMURA, P.M. and FERREIRA, W.A. 1997. "Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysts of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*". Am. J. Trop. Med. Hyg. 57

## NUEVAS FRACCIONES ANTIGÉNICAS PA

(3): 354-357.

33. WHITE, A. C. Jr. 1997. "Neurocysticercosis: A major cause of neurological disease worldwide". Clin. Infect. Dis. 24: 101-115.