

DETECCION DE ANTIGENOS DE LA LARVA DE *Taenia solium* MEDIANTE LA TECNICA DE ELISA

Carmenza Murillo*, Claudia Diaz*, Pablo Lorenzana**, Santiago Nicholls* y Augusto Corredor**

* Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud - AA80080

** Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia.

RESUMEN

Se describe la optimización de las variables en un ELISA sandwich asimétrico para la detección de antígenos circulantes de larva de *Taenia solium* empleado como estándar líquido intraquistico obtenido del parásito y como suero inmune anticisticercario absorbido con líquido cefalorraquídeo (LCR) normal lo que permite detectar 50 ng/ml de antígeno. Se utilizaron muestras de LCR liofilizadas; bajo estas condiciones de almacenamiento la especificidad obtenida fue del 63% al analizar 24 LCR negativos para neurocisticercosis por tomografía computarizada cerebral, y 15 LCR de pacientes que mostraban calcificaciones. El coeficiente de variación interensayo está dentro de los límites aceptados para el ELISA.

ABSTRACT

The optimization of the variables in an asymmetrical ELISA sandwich for the detection of circulating antigens of the larvae of *Taenia solium* is described. Intracystic liquid (obtained from the parasite) and an anticystic immune serum absorbed with normal cerebral spinal fluid (CSF) were used in the assay obtaining a detection limit of 50 ng/ml of antigen. When tests with freeze dried CSF were carried out, the specificity obtained was greater than 63% from 24 CSF negatives for neurocystercosis (by computerized cerebral tomography) and 15 CSF from patients showing calcifications. The coefficient of variation in these trials was between the acceptable limits for an ELISA test.

INTRODUCCION

La detección de anticuerpos (ACS) específicos en neurocisticercosis (NC) se ha empleado como ayuda diagnóstica durante cerca de 20 años (1). Entre las pruebas

empleadas el ELISA tiene valores de sensibilidad y especificidad mayores del 70% (2), debido a la presencia de falsos negativos (3), y que durante el seguimiento de los pacientes después de cirugía o quimioterapia el nivel de Ac no parece correlacionar con la evolución de la enfermedad (4).

La determinación de los antígenos (Ags) libres de larva de *T. solium* podría ser muy útil como inmunodiagnóstico de NC, especialmente si éstos se pudiesen determinar en el grupo de falsos negativos para Acs y ser correlacionados con el estado de la enfermedad.

Aunque el ELISA directo para la determinación de Ags (DAS) presenta ventajas relacionadas con sensibilidad y especificidad el empleo del ensayo sandwich asimétrico permite establecer la posible presencia de determinantes antigénicos comunes entre el hospedero y el parásito (5), necesarios probablemente para su interacción. En este artículo se describen las condiciones experimentales encontradas para la detección de Ags libres de *T. solium* por el ELISA. La especificidad de la prueba se determina al analizar 24 LCR negativos por tomografía computarizada (TC) cerebral para NC y 15 LCR de pacientes cuyas TC muestran sólo calcificaciones.

La TC es un método radiológico que permite la reproducción mediante imágenes de una sección del cuerpo humano con el fin de ver y estudiar sus estructuras anatómicas, siendo más sensible que los rayos X. A pesar de ser el más utilizado actualmente en el diagnóstico de enfermedades neurológicas, presenta artificios (errores en la adquisición, proceso y reconstrucción de la imagen), causados por movimientos del paciente, elementos metálicos dentro del mismo, etc. y tiene una limitante la distancia entre los cortes.

MATERIALES Y METODOS

Muestras: se utilizaron 24 LCR como controles negativos y 15 con calcificaciones con base en TC cerebrales, estas muestras se liofilizaron y se conservaron a -20 °C.

Antígenos: Se emplean dos antígenos: a) extracto soluble de cisticerco preparado de acuerdo a la metodología descrita por Molinari (6) y b) el líquido intraquístico que se obtiene directamente de los cisticercos en condiciones estériles (7). A los dos antígenos se les determina la concentración de proteínas por el método de Lowry y se almacenan en alícuotas a -20 °C

Preparación del suero inmune: Los antisueros anticisticerco se obtienen en conejos inoculando líquido intraquístico (LI) y extracto soluble por vía intradérmica múltiple de acuerdo al procedimiento descrito por Vaitukaitis y colaboradores (9). Después

de sangrar los animales, la fracción de globulina se prepara siguiendo el proceso de extracción del ácido octanoico (10). Los títulos del suero inmune se determinan mediante el ELISA indirecto para la detección de Acs (11) empleando como conjugado enzimático anti-IgG de conejo unido a fosfatasa alcalina.

El antisuero contra LCR normal se preparó en el grupo de Inmunología del Instituto Nacional de Salud.

ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTIGENOS

1- Adsorción del antígeno a la fase sólida: 200 μ l de los Ags en un rango de concentraciones de 1 - 5000 ng/ml ó 200 μ l de las muestras de LCR en diluciones seriadas: 1:100 a 1:6400 en solución reguladora carbonato-bicarbonato 0.05 M, pH 9.6, se colocan en placas de poliestireno Immulon I y se incuban durante 18 horas a 4°C. Después de la adsorción de los Ags o de las muestras a la fase sólida, los posibles sitios activos en la placa se bloquean con caseína hidrolizada (8) en solución reguladora de fosfato salino 0.15 M, pH 7.4 durante 4 horas a 24°C. Al finalizar el bloqueo las placas se lavan tres veces con la solución reguladora anterior más tween 20 al 0.05%.

2- Incubación del antígeno con el anticisticerco: la dilución y el tiempo óptimo de incubación de los sueros inmunes se determinan colocando 200 μ l del antisuero en diluciones 1:1000, 1:2500, 1:5000 y 1:10000. El complejo Ag-Ac se incuban durante 3, 6, 18, 24 y 30 horas a 4°C. Se repite el proceso de lavado con PBS-tween.

3- Cuantificación de la reacción: la formación del complejo Ag-Ac se determina en forma indirecta usando el sistema de detección anti-IgG de conejo-fosfatasa alcalina-paranitrofenilfosfato, de acuerdo a la metodología generalmente empleada en los inmunoensayos enzimáticos (10).

4- Ensayo de aditividad para la prueba de ELISA: la exactitud se determina verificando si los componentes del inmunoensayo, por sí mismos pueden causar errores sistemáticos en la prueba. Las diluciones del LI para la curva estándar se realizan en LCR normal puro, diluido en solución reguladora carbonato-bicarbonato 0.05 M, pH 9.6. Estas soluciones de Ag soluble se hace reaccionar con el anticisticerco absorbido y no absorbido con LCR normal y con suero normal de conejo al 1%. La absorción se realiza durante 10 minutos a 37°C en una relación anticisticerco/LCR v/v. La reacción Ag-Ac se efectúa a 4°C durante 18 horas y su detección se hace siguiendo la metodología descrita en 3.

Procesamiento y análisis de datos: Los datos fueron procesados utilizando el programa Dbase III plus y los análisis estadísticos realizados mediante el programa SPSS que permite calcular para cada ensayo parámetros de sensibilidad (S),

especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN), confrontando las pruebas contra la TC como patrón de referencia.

RESULTADOS

Las variables que permiten definir las mejores condiciones para el inmunoensayo de antígenos libres de larva de *T. solium* están dadas por:

a) **Concentración del suero inmune:** el título del antisuero se determina en diferentes concentraciones del LI durante un período de incubación de 18 horas a 4°C (gráfica 1). Se observa cómo una relación directa entre los valores de absorbancia y la concentración aparecen claramente a partir de 10 ng/ml en las diluciones 1:1000 y 1:2500 del suero inmune y de 100 ng/ml para las diluciones 1:5000 y 1:10000 del mismo. Al emplear como Ag extracto soluble con el antisuero homólogo se obtiene un valor de absorbancia constante e igual a 0.2 para 1, 10, 50, 100 ng/ml en las diluciones 1:1000 y 1:2500 del antisuero.

b) **Efecto del tiempo usado en la incubación antígeno-anticuerpo:** El tiempo de incubación de la reacción Ag-Ac se varía de 3 a 30 horas para encontrar su valor óptimo que corresponde al enlace máximo. La gráfica 2 muestra un aumento en los valores de absorbancia para tiempos de incubación de 6, 18, y 24 horas, siendo además similares para tiempos de 18 y 24 horas. Con un período de reacción de 3 horas no es posible detectar Ag en todo el rango de concentración. Para un tiempo de incubación de 30 horas los resultados obtenidos muestran valores de absorbancia más bajos a los logrados con solamente 6 horas de reacción.

c) **Uso de caseína como agente de bloqueo:** La influencia de la concentración de caseína hidrolizada en la disminución o inhibición del enlace no específico se observa en la gráfica 3; para porcentajes de caseína menores de 0.37% el enlace no específico es alto en concentraciones menores de 10 ng/ml, un cambio en el porcentaje de caseína de 0 a 0.37% produce un aumento en los valores de absorbancia en un intervalo de concentración para el LI mayor o igual a 10 ng/ml. Sin embargo, cuando la concentración del agente de bloqueo es mayor de 0.37% los valores de absorbancia que se logran son menores a aquellos obtenidos en ausencia de caseína en concentraciones de Ag mayores o iguales a 10 ng/ml.

La gráfica 4 muestra el efecto del tiempo de incubación del agente de bloqueo en la especificidad de la prueba: con períodos menores de 4 horas el enlace no específico es alto, solamente con un tiempo igual a 4 horas se obtienen valores de absorbancia menores de 0.1 para concentraciones que corresponden a 0 y 1 ng/ml del Ag. Con períodos de bloqueo mayores a 4 horas se observa una disminución en los valores de absorbancia en todo el rango de concentración.

d) Detección del antígeno estándar en LCR normal: el ensayo de aditividad para LI disuelto en LCR normal puro y en dilución 1:100, muestra un aumento considerable en los valores de absorbancia en todo el rango de concentraciones con respecto al LI disuelto en solución reguladora carbonato-bicarbonato (gráfica 5). Además, los valores obtenidos en una concentración igual a 0 y 1 ng/ml transforman el ensayo en una prueba inespecífica. Solamente cuando se absorbe el antisuero con LCR normal y se incuba luego con el estándar preparado en LCR normal diluido 1:100, se obtienen valores de absorbancia semejantes a los logrados con el LI diluido en solución reguladora carbonato-bicarbonato.

e) Sensibilidad del inmunoensayo: el utilizar LI como estándar permite aumentar la sensibilidad de la prueba a un rango de concentración mayor de 10 ng/ml.

f) Especificidad de la prueba: experimentalmente se encuentra en 100 determinaciones un punto de corte de 0.03 ± 0.01 para una concentración igual a 0 ng/ml. Para el control negativo en la dilución 1:200 y 1:400 el valor de absorbancia promedio es de 0.07 ± 0.01 ; teniendo en cuenta estos resultados al tomar como referencia un valor menor a 0.1 se observa que en la dilución 1:400 los LCR control presentan una dispersión menor y una especificidad mayor así se obtiene que de 24 LCR negativos, 15 son negativos para Ag libre y 9 son positivos; de los 15 LCR de pacientes con calcificaciones, 10 resultan negativos y 5 positivos.

El coeficiente de variación interensayo para el control negativo y para el estándar (LI) a una concentración de 50 ng/ml es de 17% y 5% respectivamente.

DISCUSION DE RESULTADOS

En los ensayos realizados en fase sólida, la velocidad y porcentaje de adsorción de las proteínas al polímero depende de su concentración (12), al realizar este ELISA colocando el LI y el LCR en diferentes concentraciones es necesario incubar durante 24 horas a 4°C para que el sistema fase sólida-proteína alcance el equilibrio, logrando así el máximo porcentaje de adsorción. Además el uso de 200 μ l de muestra en lugar del volumen generalmente empleado (100 μ l) aumenta la superficie de área ocupada en el pozo y por lo tanto la sensibilidad teórica del ensayo (13).

De acuerdo a la ley de acción de masas los resultados obtenidos (gráficas 1 y 2) muestran una influencia directa de la concentración y el tiempo de incubación del suero inmune en la detección de Ag, sin embargo al obtener resultados semejantes con el suero inmune en dilución 1:1000 y 1:2500 (gráfica 1) se selecciona la dilución 1:1000 porque en todos los inmunoensayos de tipo sandwich, la máxima sensibilidad se obtiene en presencia de una gran concentración de antisuero (14), al emplear un Ac policlonal la mayor inmureactividad se obtiene después del tiempo de incubación necesario para que la mezcla de Acs presentes en el suero inmune pueda reaccionar

y alcanzar el equilibrio (13). Este fenómeno se observa claramente en la gráfica 2 al obtenerse un tiempo de reacción óptimo entre 18 y 24 horas, siendo 3 y 6 horas insuficientes y 30 horas un período excesivo, que lleva a desnaturalización y/o disociación del complejo formado.

Uno de los mejores agentes de bloqueo empleados en los inmunoensayos en fase sólida es la caseína hidrolizada (8), pero los resultados muestran que es necesario determinar para cada ELISA el tiempo y la concentración óptimas, pues el usar variables diferentes a las encontradas (gráficas 3 y 4) la inmunorreactividad del sistema disminuye bien sea por un enlace no específico alto, pérdida en la sensibilidad de la prueba o valores de absorbancia más bajos en todo el rango de concentraciones empleadas.

Inicialmente podría pensarse que el empleo de un Ac policlonal, obtenido en conejo, no purificado por cromatografía de afinidad, genera un inmunoensayo inespecífico. Sin embargo la absorción del suero inmune con suero normal del conejo al 1%, origina una gráfica con valores semejantes a los obtenidos con el Ac sin absorber, a excepción del valor logrado para 0 ng/ml (gráfica 5). Aunque no aparece en la figura la reacción del estándar con antilíquido cefalorraquídeo normal, produce una curva casi idéntica a la lograda para el sistema LI-anticisticercos en solución reguladora carbonato-bicarbonato.

Aunque no aparece en las gráficas 1 y 2 el empleo del antígeno soluble como estándar disminuye notoriamente la sensibilidad del inmunoensayo debido tal vez a la presencia en este extracto crudo de factores que pueden interferir en el mismo.

La baja sensibilidad obtenida con el extracto soluble también es encontrada por Correa y colaboradores (4) quienes al evaluar sueros inmunes obtenidos con varios factores antígenos de *T. solium* logran valores de absorbancia muy bajos (0.1 y 0.2) en la detección serológica del parásito utilizando como antisuero anti-extracto soluble.

La existencia de factores antígenos comunes entre LCR normal y el LI obtenido de las larvas *T. solium* se demuestra al realizar el ensayo de aditividad usando como diluyente para el estándar LCR normal concentrado y/o diluido 1:100 (gráfica 5). El suero inmune anticisticercos reacciona con el LCR normal produciendo un aumento en la inmunorreactividad del sistema con pérdida de la especificidad. Este comportamiento encontrado tanto para el LCR concentrado como en dilución 1:100 elimina como posible causa el efecto producido en gran número de inmunoensayos relacionado con la pérdida de especificidad cuando se manejan muestras concentradas, por componentes tales como lípidos, iones y proteínas presentes (14). La especificidad del ensayo se recupera solamente absorbiendo el suero inmune anticisticercos con LCR normal, logrando valores de absorbancia semejantes a los obtenidos al disolver el estándar en solución reguladora carbonato-bicarbonato.

La relación antigénica entre el LCR normal y antígeno de larva de *T. solium* observada, forma parte de un fenómeno bastante conocido en la relación hospedero-parásito, así la presencia de proteínas comunes entre el hospedero y las larvas de varios metacéstodos ha sido descrita anteriormente por algunos investigadores: Katti y colaboradores (15) al realizar el análisis antigénico de la larva de *T. solium* mediante inmunolectroforesis cruzada identifican 8 proteínas comunes entre el parásito y el tejido normal de músculo de cerdo. Kuns y colaboradores (16) al estudiar la semejanza en composición antigénica entre el LI de *T. crassiceps* y *T. solium* encuentran 9 proteínas comunes entre el suero de ratón y el LI de *T. crassiceps*.

La especificidad obtenida (63%) podría ser aumentada de acuerdo con Téllez-Giron y colaboradores (17) quienes al realizar el mismo tipo de ensayo logran una especificidad del 100% utilizando solamente muestras de LCR frescas. Además se conoce que la TC es menos sensible que la resonancia nuclear magnética (18) y por lo tanto la clasificación de las muestras como negativas o positivas basadas en la TC cerebral lleva implícito un error que puede originar falsos positivos y/o falsos negativos.

Bajo las condiciones descritas anteriormente, este inmunoensayo sirve inicialmente en la identificación de moléculas que presentan actividad semejante a los Ags de la larva de *T. Solium*.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se llevó a cabo con el auspicio de Colciencias, el Banco de la República y Laboratorios Merck de Colombia.

Expresamos nuestros agradecimientos a los Doctores Ricardo Fernández, Neurólogo Hospital San Juan de Dios, César Maldonado de la Fundación Instituto Neurológico de Colombia y Oscar Pinzón del Hospital San Juan de Dios por la lectura de las tomografías y a Daniel Rodríguez por su trabajo gráfico.

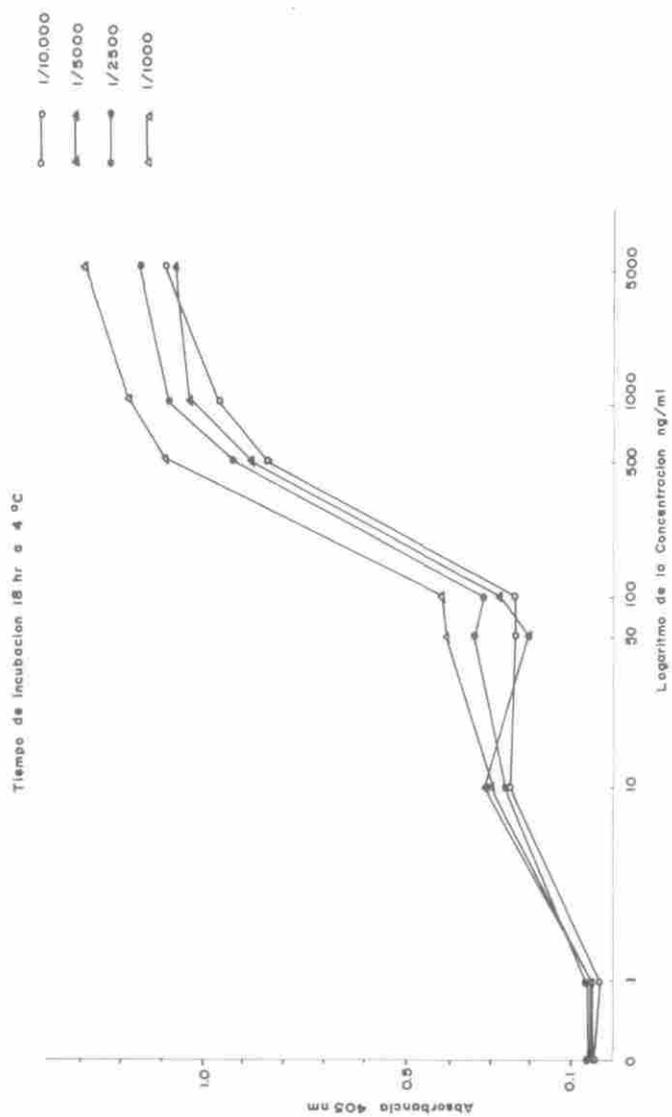


Figura 1. Titulación del suero inmune para el sistema intranasal-antigenico.

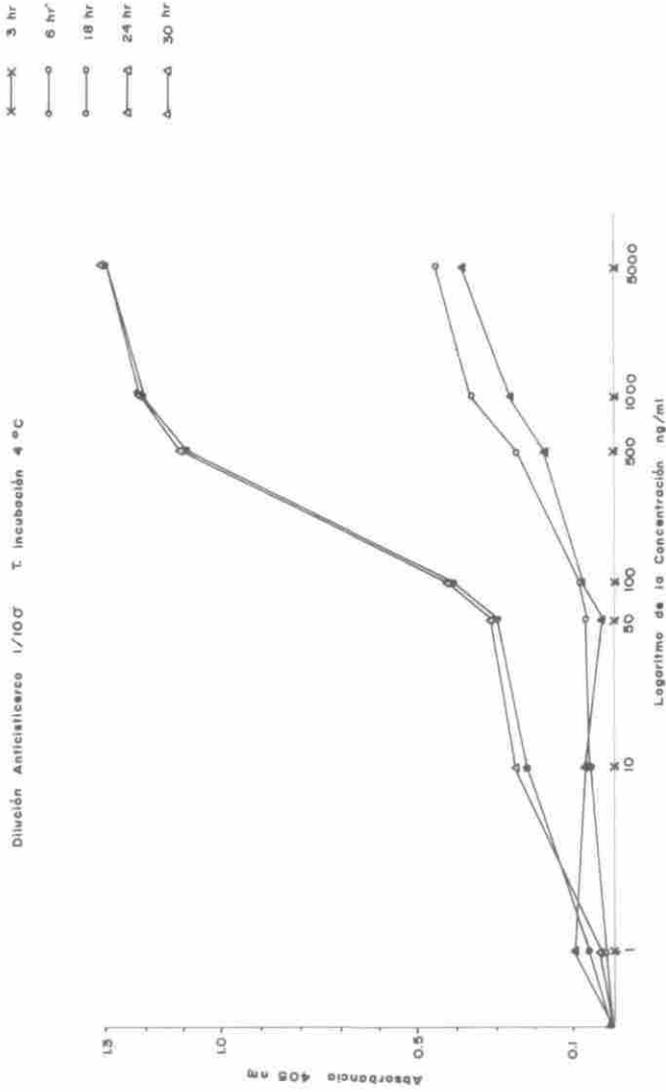


Figura 2. Cinética de reacción Líquido intraquístico - Anticistricero.

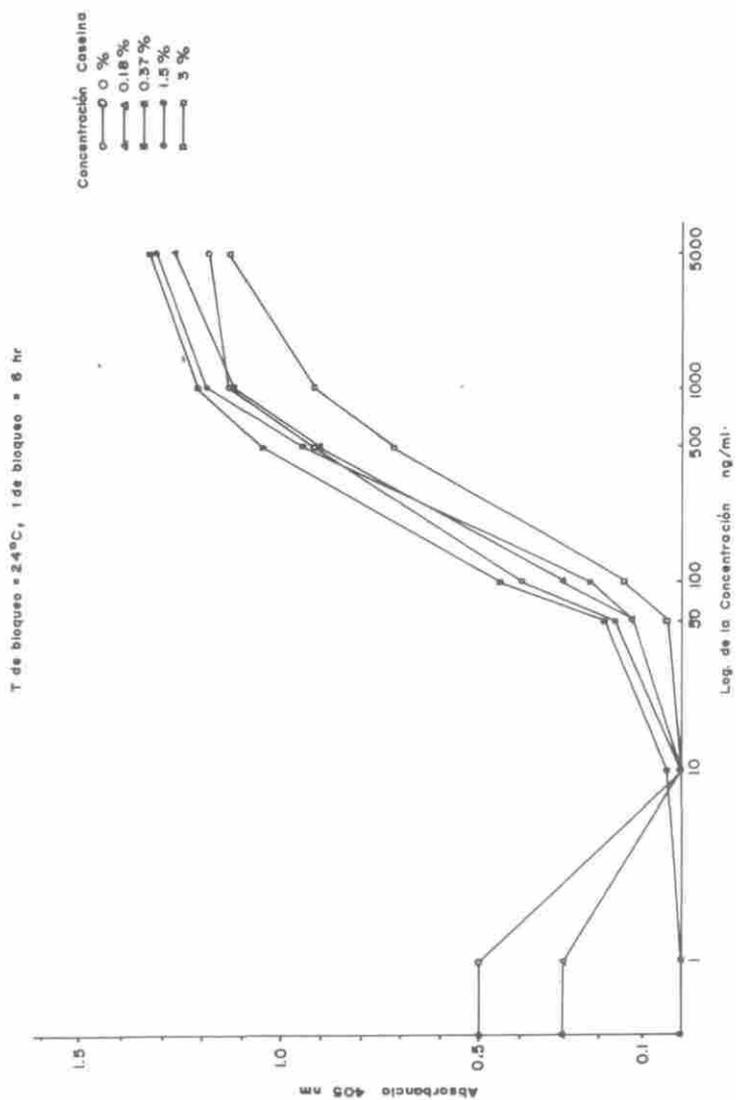


Figura 3. Efecto de la concentración de caseína en la sensibilidad y especificidad de la prueba.

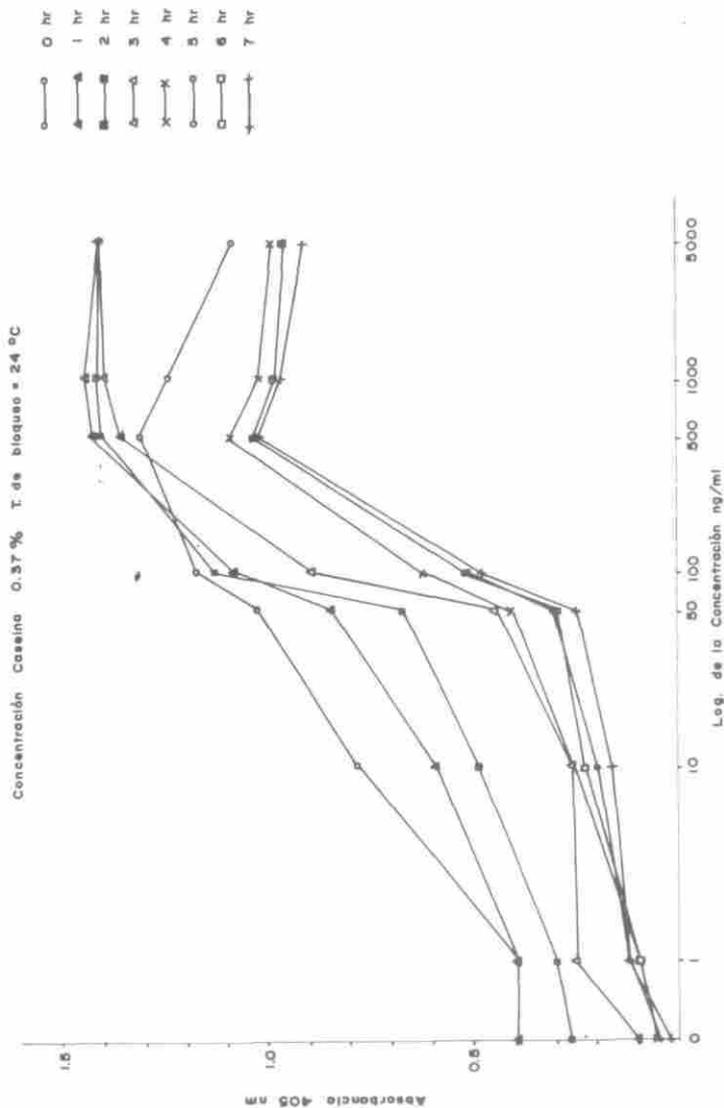


Figura 4. Efecto del tiempo de incubacion en la especificidad de la prueba.

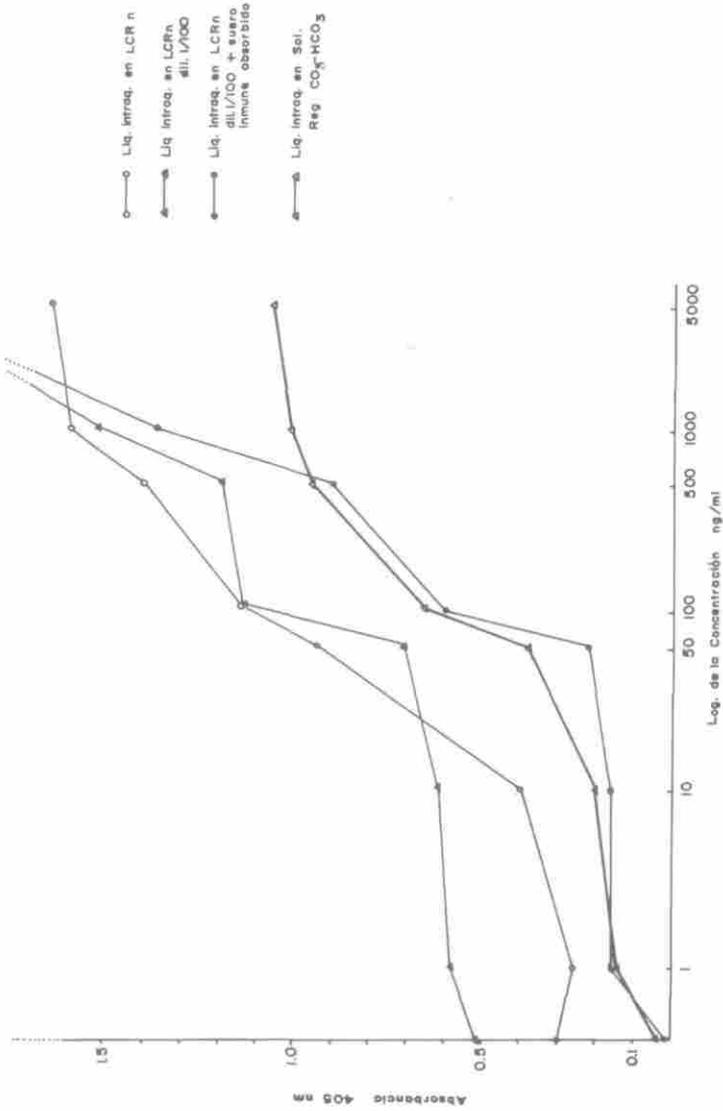


Figura 5. Ensayo de aditividad.

BIBLIOGRAFIA

1. Rydzewski, A. K.; Chishalm, E. S. y Kagan, I. G., *J. Parasitol*; **1975**. 61, 154.
2. Espinosa, B.; Ruiz-Palacios, G.; Tovar, A.; Sandoval, M. A.; Plancarte, A. y Flisser, A., *J. Clin Microbiol*, **1986**. 24. 536.
3. Chang, K. H.; Kim, W. S.; Cho, S. Y.; Han, M. Ch. y Kim, Ch.w. *AJNR*, **1988**. 9, 125.
4. Correa, D.; Sandoval, M. A.; Harrison, L. S.; *et al. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*, **1989**, 83, 814.
5. Yolken, R. H., *Rev Infect Dis*, **1982**. 4, 35.
6. Molinari, J. L.; Meza, R. y Tato, P., *Exp Parasitol*, **1983**. 56. 327.
7. Baily, G. G.; Mason, P. R.; Trijssenar, F. E. J. y Lions, N. F., *Trans. R. Soc. Trop Med. Hyg.*, **1988**. 82, 295.
8. Vogt, R. F.; Phillips, D. L.; Henderson, L. O.; Whitfield, W, y Spierto, F. W., *J. Immunol Methods*, **1987**. 101, 43.
9. Vaitukaitis, J.; Robbins, J. B.; Nieschlag, E. y Ross, G. T., *J. Clin. Endocr.*, **1971**. 33, 988.
10. McKinney, M. M. y Parkinson, A., *J. Immunol. Methods*, **1987**. 96, 271.
11. Voller, A.; Bidwell, D. E. y Bartlett, A., *J. Clin. Pathol.*, **1978**. 31, 507.
12. Pesce, A. J.; Ford, D. J.; Gaizutis, M. y Pollak, V. E.. *Biochim. Biophys. Acta*, **1977**. 492, 399.
13. Lovborg, U. "Guide to solid phase immuno assays". A/S Nunc, Roskilde Denmark, **1984**.
14. Smith, S. W. y Feldkemp, C. S., "Immunoassay a Practical Guide" Chau, D. W. y Perlstein, M. T., eds. New York, Academic Press, **1987**, p.49-95.
15. Katti, M. K.; Jagannath, C.; Gokul, B. N.; Chanframuki, A. y Sehgal, S., *Indian J. Med. Res.*, **1990**. 91, 39.

16. Kunz, J.; Kalinna, B.; Watschke, V. y Geyer, E., *Int. J. Med. Microbiol.*, **1989**, 271, 510.
17. Tellez-Girón, E.; Ramos, M. C.; Dufour, L.; Alvarez, P. y Montante, M., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1987**, 37, 169.
18. Suss, R. A.; Maravilla, K. R. y Thompson, J., *AJNR*, **1986**, 7, 235.