

SEROPREVALENCIA DE CISTICERCOSIS PORCINA EN EL MUNICIPIO DE GALERAS, DEPARTAMENTO DE SUCRE, MEDIANTE LA PRUEBA DE INMUNOENSAYO ELISA CON LA FRACCIÓN POLIPEPTÍDICA DE 53 kDa DEL METACESTODO *Taenia solium*.

**EFRAIN CARDOZO MOLINA
OSWALDO SIERRA MERCADO**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGÍA
SINCELEJO, SUCRE
2007**

SEROPREVALENCIA DE CISTICERCOSIS PORCINA EN EL MUNICIPIO DE GALERAS, DEPARTAMENTO DE SUCRE, MEDIANTE LA PRUEBA DE INMUNOENSAYO ELISA CON LA FRACCIÓN POLIPEPTÍDICA DE 53 kDS DEL METACESTODO *Taenia solium*.

**EFRAIN CARDOZO MOLINA
OSWALDO SIERRA MERCADO**

**Director:
EYDYELIANA MONTH JURIS
Biologa**

**Codirector
JULIO GIRALDO FORERO
Lic Bio, M.Sc en Microbiología**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGÍA
SINCELEJO, SUCRE
2007**

“Únicamente los autores son responsables de las ideas expuestas en el presente trabajo” (Artículo 12, resolución 02 de 2003).

Nota de aceptación:

Firma Del Presidente Del Jurado

Firma Del Jurado

Firma Del Jurado

Firma Del Jurado

Sincelejo, 2007

DEDICATORIA

He dedicado este trabajo al ser más supremo que pueda existir, Dios, y a dos personas incondicionales las que más quiero en este mundo, mi padre y especialmente mi madre por haberme permitido la realización de cada uno de mis sueños gracias a su gran esfuerzo, amor y confianza. También agradezco a todos mis familiares y amigos quienes creyeron en mí y me daban su voz de aliento, la cual permitió el desarrollo de mi formación personal.

Efraín Cardozo...

DEDICATORIA

Este logro que he alcanzado está dedicado a Dios, el ser supremo.

A las personas que más amo en el mundo en especial a mi madre que con esfuerzo, sacrificio y trabajo me estuvo apoyando hasta el último momento de su vida, a mi padre por estar presente en los momentos más difíciles.

A mis hermanos, Mirla, Yajaira, Johana, Euberto y David por el apoyo incondicional que me brindaron.

Oswaldo Sierra..

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GENERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. ESTADO DEL ARTE	19
GENERALIDADES	19
BASES BIOLÓGICAS DE LA TENIASIS/CISTICERCOSIS	19
Ciclo de Vida de la <i>Taenia solium</i>	19
Características Morfológicas.	21
CLASIFICACION TAXONÓMICA DE <i>Taenia solium</i>	24
CISTICERCOSIS PORCINA	25
DIAGNÓSTICO	26
Examen premortem o de lengua.	26
Examen postmortem o necropsia.	27
Métodos de diagnóstico serológicos.	27
Inmunolectrotransferencia ligada a enzima (EITB) o westernblot.	28
Ensayo inmunoenzimático ELISA	28
EPIDEMIOLOGÍA	31
IMPORTANCIA ECONÓMICA	34
TRATAMIENTO DE LA CISTICERCOSIS PORCINA	35
CONTROL Y PREVENCIÓN	35
4. METODOLOGÍA	36
LUGAR DE ESTUDIO	36
TIPO DE ESTUDIO Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA	36
TRABAJO DE CAMPO	37
Diagnóstico de cisticercosis porcina por examen premortem	37
Examen de lengua	37
Diagnóstico de cisticercosis porcina por examen postmortem	37
Inspección por necropsia	37
Obtención de muestras sanguínea	38
Transporte y procesamiento de las muestras	38
TRABAJO DE LABORATORIO	38
Obtención del antígeno total (AgT).	38
Obtención de la fracción polipeptídica de 53 kDa por electroforesis en poliacrilamida-bisacrilamida (SDS-PAGE) y elusión pasiva.	39
Medición de la concentración proteica de la fracción de 53 kDa.	40
Serología	40
Controles	40
Técnica de ensayo inmunoenzimático (ELISA) para el diagnóstico de	

cisticercosis porcina	41
Interpretación de la prueba	41
Análisis estadístico.	42
5. RESULTADOS	43
CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	43
EVALUACIÓN FÍSICA : EXAMEN PREMORTEM Y POSTMORTEM	44
OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN DE 53 KDA POR ELECTROFORESIS (SDS-PAGE) Y ELUSIÓN PASIVA	46
CUANTIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA DE 53 KDA POR EL MÉTODO DE BRADFORD	47
SEROPREVALENCIA DE CISTICERCOSIS EN PORCINOS MEDIANTE EL INMUNOENSAYO ELISA CON LA FRACCIÓN DE 53 KDA	48
EVALUACIÓN DE POSIBLES FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA SEROPOSITIVIDAD DE LA CISTICERCOSIS PORCINA	52
REGRESIÓN LOGÍSTICA	54
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS	56
7. CONCLUSIONES	61
8. RECOMENDACIONES	62
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	69

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Valoración de la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativos (VPN) y reactividad antigénica (RA) de las fracciones 29,35,53,66,77 y 92 kDa del metacéstodo de <i>Taenia solium</i> Fuente: Giraldo <i>et al</i> / En: Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. Vol. 16, No 2 (2004); p 415.	30
Tabla 2. Serología de sueros para reacciones cruzadas de las fracciones de 29, 53, 66, 77 y 92 kDa. Protozoos	30
Tabla 3. Serología de sueros para reacciones cruzadas de las fracciones de 29, 53, 66, 77 y 92 kDa. Helmintos	31
Tabla 4. Características descriptivas de la población de estudio. Galeras – Sucre	43
Tabla 5. Relación entre los resultados de la prueba serológica de ELISA contra la fracción de 53 kDa y el sexo de la población de estudio. Galeras – Sucre	50
Tabla 6. Relación entre los resultados de la prueba serológica de ELISA contra la fracción de 53 kDa y la Raza de la población de estudio. Galeras – Sucre.	50
Tabla 7. Relación entre los resultados de la prueba serológica de ELISA contra la fracción de 53 kDa y la procedencia de la población de estudio. Galeras – Sucre.	50
Tabla 8. Relación entre los resultados de la prueba serológica de ELISA contra la fracción de 53 kDa y los grupos étnicos de la población de estudio. Galeras – Sucre	51
Tabla 9. Relación entre los resultados de la prueba serológica de ELISA contra la fracción de 53 kDa y los pesos de la población de estudio. Galeras – Sucre.	51
Tabla 10. Tabla de contingencia para análisis de Chi – cuadrado entre seropositividad y el sexo de los individuos. Galeras - Sucre.	52
Tabla 11. Estimación de riesgo para el sexo de los animales. Galeras – Sucre.	53
Tabla 12. Tabla de contingencia para análisis de Chi – cuadrado entre seropositividad y la raza de los individuos. Galeras – Sucre.	53

Tabla 13. Tabla de contingencia para análisis de Chi – cuadrado entre 53 seropositividad y la procedencia de los individuos. Galeras – Sucre

Tabla 14. Tabla de contingencia para análisis de Chi – cuadrado entre 54 seropositividad y la edad de los individuos. Galeras – Sucre

Tabla 15. Tabla de contingencia para análisis de Chi – cuadrado entre 54 seropositividad y el peso de los individuos. Galeras – Sucre.

Tabla 16. Resultado de Odds Ratio a partir de la evaluación del efecto de las 55 variables en estudio sobre la presencia de anticuerpos mediante la prueba de regresión logística.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	20
Figura 2. Céstodo adulto de <i>Taenia solium</i>	21
Figura 3. Escólex de <i>Taenia solium</i> .	21
Figura 4. Proglótidos inmaduros, maduros y grávidos de <i>Taenia solium</i>	22
Figura 5. Huevo de <i>Taenia sp</i>	23
Figura 6. Cisticercos vesicular de <i>Taenia solium</i> .	24
Figura 7. Seroprevalencia de cisticercosis porcina en Colombia	33
Figura 8. Prevalencia de cisticercosis porcina por examen premortem para el municipio de Galeras	44
Figura 9. Cisticercosis muscular: Múltiples larvas de <i>Taenia solium</i> en el corazón de un cerdo positivo por examen postmortem.	45
Figura 10. Prevalencia de cisticercosis porcina por examen postmortem para el municipio de Galeras.	45
Figura 11. Gel de electroforesis al 10 % con el antígeno total donde se muestra la fracción de 53 KDa. 1. Marcadores de peso Molecular bajo. 2 Marcadores de peso Molecular alto. Fuente: El autor, Bogota, 2006	46
Figura 12. Gel de electroporesis al 10% con la fracción de 53 KDa 5. Pesos moleculares altos. 7 y 8 Ag Total. 11y 12 Fracción de 53 kDa. 15 Pesos moleculares bajos	47
Figura 13. Niveles de IgG total en la población objeto de estudio. 48 Fotografía del microplato con los resultados obtenidos. Pozos A1 – A2: Control positivo, Pozos A3 - A4: Control negativo, Pozos H11 – H12:Blanco, Pozos A5 – H10: Muestras problemas	48
Figura 14. Niveles de IgG total en la población objeto de estudio. 49 Distribución de los valores de absorbancia de los sueros en la población objeto estudio evaluada mediante la técnica de ELISA	49
Figura 15. Seroprevalencia de cisticercosis porcina para el municipio de Galeras.	49

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. FORMULA PARA DETERMINAR EL TAMAÑO DE MUESTRA REPRESENTATIVA EN ESTUDIOS DESCRIPTIVOS.	70
ANEXO B. CONSENTIMIENTO INFORMADO	71
ANEXO C. ENCUESTA PARA CISTICERCOSIS PORCINA UNIVERSIDAD DE SUCRE	72
ANEXO D. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ANTIGÉNICO TOTAL DE <i>Taenia solium</i>	73
ANEXO E. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS DE POLICRILAMIDA-BISACRILAMIDA (SDS-PAGE).	74
ANEXO F. SOLUCIÓN BUFFER DE ELUCIÓN (TRIS-HCL 0,25 M; EDTA 0,25 M; PH 9.0)	77
ANEXO G. SOLUCIÓN COLOREADORA (0,025% AZUL DE COOMASSIE R-250; 40% ALCOHOL METÍLICO; 7% ÁCIDO ACÉTICO)	77
ANEXO H. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA TÉCNICA DE BRADFORD.	78
ANEXO I. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELISA	78
ANEXO J. FORMULAS PARA DETERMINAR LA PREVALENCIA.	80

RESUMEN

La cisticercosis porcina es causada por la forma larval del metacesto de *Taenia solium*, es una enfermedad zoonótica común en países en desarrollo y un importante problema de salud pública a nivel mundial. En el presente estudio se determinó la seroprevalencia de la cisticercosis porcina y sus posibles factores de riesgos en cerdos sacrificados del municipio de Galeras mediante tres técnicas diagnósticas: examen premortem (palpación de lengua y región axial), postmortem (visualización de larvas de *Taenia solium* en masa muscular) y el ensayo serológico ELISA. La serología fue evaluada para detectar anticuerpos contra *Taenia solium* en porcinos utilizando como antígeno la glicoproteína de 53 kDa aislada de un extracto total larval de *Taenia solium* mediante Electroforesis SDS – PAGE y elusión pasiva. Los posibles factores de riesgos fueron analizados a través de análisis de regresión logística. Se halló una prevalencia del 0.0% y 0.52% con examen premortem y postmortem, respectivamente, y del 24.32% con el ensayo serológico ELISA. Los análisis de regresión logística mostraron que las variables Sexo, Edad, Raza y Procedencia no representan un factor de riesgo para la infección ($P > 0.005$), sin embargo la característica ser hembra se comportó como un factor de predisposición. La alta prevalencia de cisticercosis porcina encontrada en este municipio hace necesario la formulación de medidas de prevención y control.

Palabras claves: *Taenia solium*, cisticercosis, ELISA, Seroprevalencia.

ABSTRACT

The pig cysticercosis is caused by the larval form of the metacestode of *Taenia solium*, is developing a zoonotic disease common in countries and an important problem of health publishes at world-wide level. In the present study I determine the seroprevalence of the pig cysticercosis and its possible factors of risks in pigs sacrificed of the municipality of Galeras by means of three techniques you diagnose: examination premortem (palpation of language and axial region), postmortem (visualization of larvae of *Taenia solium* in muscular mass) and the serological test ELISA. The serology was evaluated to detect antibodies against *Taenia solium* in pigs using like antigen the glycoprotein of 53 isolated Kda of a larval total extract of *Taenia solium* by means of Electroforesis SDS - PAGE and passive elusion. The possible factors of risks were analyzed through logistic regression analysis. I am a prevalence of 0,0% and 0,52% with examination premortem and postmortem, respectively, and of 24,32% with the serological test ELISA. The logistic regression analysis showed that the variables Sex, Age, Race and Origin do not represent a factor of risk for the infection ($P > 0,005$), nevertheless the characteristic to be Female I behave like a predisposition factor. The high prevalence of found pig cisticercosis in this municipality makes the formulation necessary of measures of prevention and control.

Key words: *Taenia solium*, cysticercosis, ELISA, Seroprevalence.

INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades más comunes en nuestro medio es la cisticercosis porcina conocida como “viruela”. Esta enfermedad es causada por la forma larval del céstodo de *Taenia solium*, caracterizada por el desarrollo de quistes de 10 por 20 mm denominados *cysticercus cellulosae* y que puede localizarse en diferentes órganos y tejidos del cuerpo del animal (Burga, 1999).

El porcino (*Sus scrofa*) es el principal hospedero intermediario en forma natural de la *Taenia solium*, se infecta al consumir los huevos o proglótidos maduros del helminto adulto en ambientes donde los animales tienen acceso directo a las excretas humanas desarrollándose en estos la cisticercosis. El hombre puede verse afectado por las dos formas de presentación de la *Taenia solium*, adulto y larval, desarrollándose Teniasis o Cisticercosis según sea el caso (Burga, 1999).

La cisticercosis porcina (y la cisticercosis humana que lleva asociada) es cosmopolita pero con algunas restricciones. No existe en los países donde el integrismo musulmán o israelita prohíbe el consumo de carne de cerdo, que interrumpe el ciclo evolutivo del parásito. Por el contrario es endémica en América central, Sudamérica, África negra y África del Sur, sudeste de Asia, China o Filipinas (Euzéby, 2001).

La infección por *Taenia solium* del hombre y el cerdo, está ampliamente difundida en los países de América Latina; en México, Colombia, Perú y Ecuador se han realizado estudios epidemiológicos en comunidades rurales que han demostrado una reactividad serológica hacia antígenos de cisticercos que varía del 3% al 12% (OPS/OMS, 1994). En Colombia existen aproximadamente 1300 sitios de sacrificio de animales para consumo humano, de los cuales sólo en el 5% se efectúa inspección sanitaria de la carne; el Ministerio de Salud reportaba decomisos de

10.000 a 11.000 cerdos en el país por año (correspondientes aproximadamente a 440.000 kilogramos de carne) (OPS/OMS, 1994).

El diagnóstico de la cisticercosis porcina se puede realizar empleando el método antemortem (en pie) o el método postmortem (en la canal) (Sartí, 1997), sin embargo en Colombia estos métodos pocas veces son puestos en práctica. Otra forma para el diagnóstico de la cisticercosis porcina es a través de ensayos serológicos los cuales se basan fundamentalmente en la detección de anticuerpos anticisticercos estimulados por los diferentes estadios del parásito, y en menor medida en la detección de antígenos parasitarios (OPS/OMS, 1994). Estas técnicas son difíciles de desarrollar debido a los altos costos que representan para los pobladores de estas regiones los cuales son de escasos recursos económicos.

En nuestro país se ha demostrado el carácter endémico de la enfermedad, aunque estos resultados son difíciles de comparar debido a los diferentes métodos de diagnóstico utilizados (Giraldo *et al.*, 2000). A nivel de la Costa Atlántica y particularmente en el departamento de Sucre se tienen reportes de estudios como los realizados por Acuña y Caldera en la población de Sabanas de Pedro (2006), los cuales informan de la existencia de *Taenia solium* en esta región.

El municipio de Galeras fue seleccionado para realizar el estudio debido a la gran cantidad de cerdos que resultan con cisticercosis, según información suministrada por personas que sacrifican los cerdos y comercializan la carne, así como por quienes trabajan en el sector agropecuario, además existe un elevado consumo de carne de cerdo por su bajo costo, y un alto porcentaje de animales que se sacrifican no es sometido a ningún tipo de inspección sanitaria; el hospital regional del municipio ha reportado en los últimos 5 años más de 10 casos de pacientes con sintomatologías asociadas con la neurocisticercosis (comunicación personal) por lo que se hace necesario realizar estudios epidemiológicos orientados a

conocer la verdadera magnitud del problema, y así poder desarrollar estrategias de prevención y control.

En este sentido el presente estudio de diagnóstico serológico de cisticercosis porcina determinó la seroprevalencia de la enfermedad en cerdos sacrificados del municipio de Galeras (Sucre), por medio de la prueba de inmunoensayo (ELISA) debido a que ésta es de bajo costo y fácil manejo, utilizando como antígeno la glicoproteína de 53 kDa del metacéstodo de *Taenia solium* por ser un polipéptido de alta sensibilidad y especificidad y por que no presenta reacciones cruzadas con otras entidades parasitarias.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- ❖ Determinar la seroprevalencia de cisticercosis porcina en el municipio de Galeras, departamento de Sucre, mediante la prueba de inmunoensayo ELISA con la fracción polipeptídica de 53 kDa del metacestodo *Taenia solium*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Obtener fracciones polipeptídicas en el rango de 29 a 92 kDa a partir de un extracto crudo del metacéstodo de *Taenia solium* utilizando la técnica de electroforesis SDS-PAGE y elusión pasiva.
- ❖ Realizar examen premortem y postmortem a los cerdos sacrificados en el municipio de Galeras (Sucre).
- ❖ Identificar posibles factores de riesgos correlacionados con la seropositividad de la población porcina del municipio de Galeras (Sucre).

3. ESTADO DEL ARTE

3.1 GENERALIDADES

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define zoonosis como “aquellas enfermedades e infecciones que son transmitidas naturalmente entre animales vertebrados y humanos” (OMS, 2002). Dentro de éstas podemos encontrar la cisticercosis, la cual es una enfermedad parasitaria causada por el metacéstodo de *Taenia solium*, conocida como solitaria, que se desarrolla en el intestino del ser humano, donde su único huésped natural definitivo es el hombre y el cerdo es el principal huésped intermediario (De Aluja y Villalobos, 2000).

La transmisión de *Taenia solium* entre los huéspedes intermediarios y definitivos es más frecuente y más intensa en comunidades rurales donde el ciclo está asociado a condiciones ambientales favorables: crianza libre de cerdos que les permiten tener acceso a las heces humanas, la falta de letrinas y malos hábitos higiénicos de las personas. Se trata de una ciclozoonosis parasitaria ligada a condiciones socioeconómicas y culturales bajas (OPS/OMS, 1994).

La cisticercosis porcina es endémica en América Latina, África y Asia, no existe en países musulmanes e Israel donde se prohíbe el consumo de la carne de cerdo (Euzeby, 2001).

3.2 BASES BIOLÓGICAS DE LA TENIASIS/CISTICERCOSIS

3.2.1 Ciclo de Vida de la *Taenia solium*. La teniasis intestinal se desarrolla cuando el hombre consume carne de cerdo a medio cocer e infectada con

cisticercos, una vez en tubo digestivo las larvas eclosionan gracias a la acción de las enzimas proteolíticas y sales biliares, para anclarse al epitelio intestinal, e iniciar su transformación en el gusano adulto o solitaria. El platelminto alcanza su madurez en aproximadamente tres meses, tiempo en el cual aparecen espontáneamente proglótidos grávidos en las heces (Flisser *et al.*, 2006; Botero y Restrepo 2003).

Los cerdos pueden infectarse por su hábito coprófago adquiriendo grandes cantidades de huevos embrionados o bien, por alimentos y bebidas contaminados con huevos dispersados al destruirse los proglótidos. El embrión hexacanto (oncosfera) se libera en el aparato digestivo por acción proteolítica y se difunde sistémicamente por todo el organismo, invadiendo preferencialmente el tejido conjuntivo interfascicular de los músculos, con predilección por los de la lengua, diafragma, cuello, escapulares, intercostales, psoas, y, corazón. También pueden encontrarse en el hígado, pulmones, cerebro, globo ocular, e incluso en el tocino, especialmente cuando hay infección masiva (Cordero del Campillo y Rojo, 1999).

Figura 1.



Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*.

Fuente: Viniestra Ana. INVESTIGACIÓN Y CIENCIAS. Mayo 2006. *Taenia solium*: un parásito cosmopolita.

3.2.2 Características Morfológicas. El céstodo adulto “solitaria” presenta un cuerpo largo y aplanado cuya longitud puede superar los dos metros. Figura 2. El escólex (cabeza) posee una doble corona de ganchos y cuatro ventosas. Figura 3.

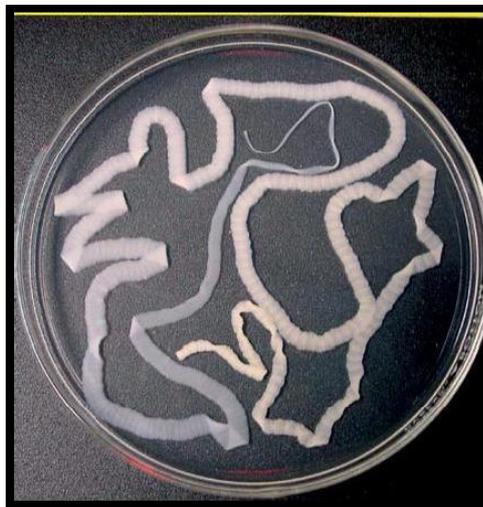


Figura 2. Céstodo adulto de *Taenia solium*.

Fuente: Rodríguez Adriana. INVESTIGACIÓN Y CIENCIAS. Mayo 2006. *Taenia solium*: un parásito cosmopolita.



Figura 3. Escólex de *Taenia solium*.

Fuente: Rábiela María. INVESTIGACIÓN Y CIENCIAS. Mayo 2006. *Taenia solium*: un parásito cosmopolita.

Los segmentos, o proglótidos arrancan de una región germinal situada en la parte inferior del escólex, los que están próximos al cuello son inmaduros, los que están continuos son maduros, provistos de órganos genitales masculino y femenino, y los más distantes son proglótidos grávidos con un útero ramificado lleno de huevos, cada proglótido mide entre 0.5 y 2.0 cm. (Flisser *et al.*, 2006). Figura 4.



Figura 4. Proglótidos inmaduros, maduros y grávidos de *Taenia solium*.

Fuente: Viniegra Ana. INVESTIGACIÓN Y CIENCIAS. Mayo 2006. *Taenia solium*. un parásito cosmopolita.

Los huevos que rellenan el útero son pequeños, microscópicos, de 40 a 45 micrones de diámetro y de forma esférica o levemente elíptica y poseen una gruesa corteza radiada. Los huevos contienen un embrión provisto de seis ganchos refringentes, denominado embrión hexacanto u oncósfera. Dentro del útero, cada huevo está rodeado por una delgada cápsula ovígera de protección, o embrióforo (Reyes,1991). Figura 5.

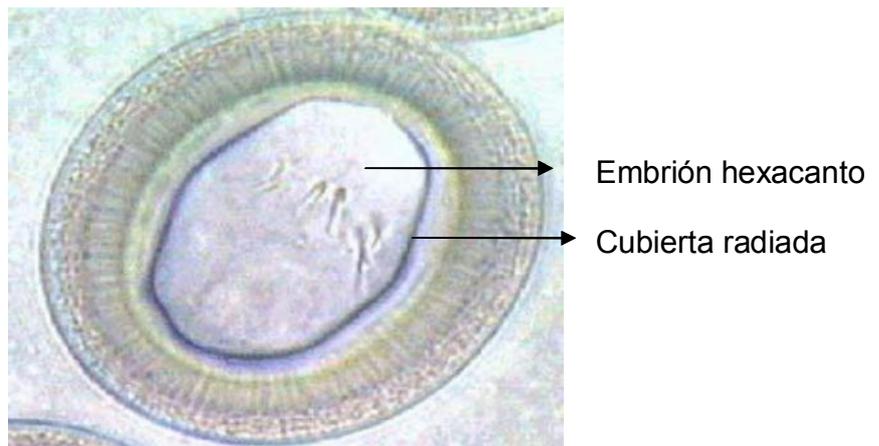


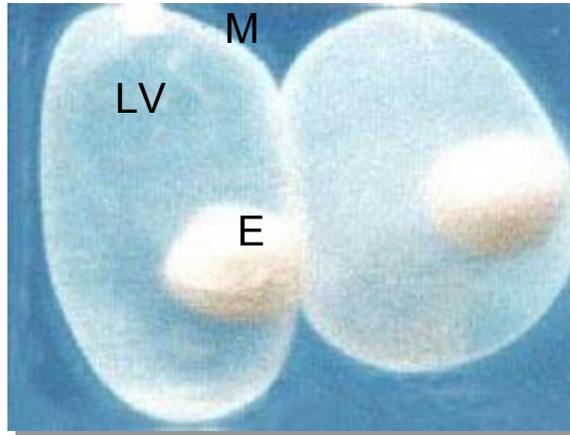
Figura 5. Huevo de *Taenia sp.*

Fuente: www.ciencia.hoje.uol.com.br/.../materia/view/3128.

La larva (*cysticercus cellulosae*) está plenamente desarrollada en una vesícula de 6 a 20 por 5 a 10 mm, esferoide o alargada formada por una cutícula y una capa parenquimatosa con algunas fibrillas musculares y una red fibrilar. Hacia la zona ecuatorial de la cara interna muestra una formación densa y esférica (el escólex invaginado) (Cordero del campillo Y Rojo, 1999).

Exámenes microscópicos revelan que al igual que en *Taenia solium* la larva presenta un rostelo armado con cuatro ventosas y una doble corona de ganchos, externos e internos. Los internos miden de 160 a 180 micrómetros y los externos

miden de 110 a 140 micrómetros .Las ventosas son circulares y su diámetro oscila entre 135 y 500 micrómetros (Ping-Chin *et al.*, 2001; Euzéby, 2001). Figura 6.



M: membrana
LV: liquido vesicular
E: escólex

Figura 6. Cisticercos vesicular de *Taenia solium*.

Fuente: Laboratorio de investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical UNINCCA.

3.3 CLASIFICACION TAXONÓMICA DE *Taenia solium*

REINO: Animal

SUBREINO: Metazoo

FILUM: Plathelminto

CLASE: Cestoidea

SUBCLASE: Cestoda

ORDEN: Cyclophyllidae

FAMILIA: Taenidae

GENERO: *Taenia*

ESPECIE: *solium*

3.4 CISTICERCOSIS PORCINA

La cisticercosis porcina es causada por la forma larval del céstodo de *Taenia solium*, caracterizada por el desarrollo de quistes de 10 por 20 mm y que puede localizarse en diferentes órganos y tejidos del cuerpo del animal, siendo el cerdo el hospedero intermediario habitual para *Taenia solium* (Burga, 1999).

El cerdo adquiere la infección a través de alimentos y agua contaminada con heces infectadas, a su vez, con huevos de *Taenia solium*, situación que se facilita en estos animales por sus hábitos coprofágicos (Pinilla *et al.*, 2003). También existe la posibilidad de que la infección ocurra cerdo a cerdo (infección secundaria), aunque en estos casos se ha demostrado que la carga parasitaria es mucho más baja que en una infección primaria (González *et al.*, 2005a), con pocos cerdos albergando un gran número de parásitos y muchos cerdos alojando un menor número de parásitos (González *et al.*, 2006).

Para la cisticercosis porcina no se ha registrado la existencia de evidencia patológica debido a que en muchos de los casos éstos cerdos son sacrificados y comercializados de forma clandestina y a muy temprana edad, lo que evita que el cisticerco sufra un proceso de calcificación y se presenten cambios a nivel de tejidos y órganos afectados. (Giraldo, 2005)

El desarrollo de cisticercos en los cerdos es bien tolerado. En general las infecciones leves o moderadas no originan cuadros clínicos. No obstante, cerdos infectados experimentalmente con 200000 huevos de *Taenia solium* presentan anorexia, fiebre, incremento en la frecuencia cardíaca y respiratoria, vómito y diarrea (OPS/OMS, 1994).

Los cisticercos se alojan en casi todos los órganos y tejidos, siendo más frecuentemente observados en lengua, músculo macetero, anconeos, tríceps,

intercostales, corazón y ojo (OPS/OMS, 1994). Sin embargo, en un estudio realizado por Ping-Chin *et al* (2001) se encontró que los sitios por orden de predilección donde se alojaron el mayor número de cisticercos fueron los músculos de las piernas, músculos torácicos, abdominal y diafragma, lengua, corazón, músculo de la traquea y testículos respectivamente.

La localización de los cisticercos en el encéfalo, se da tanto a nivel superficial como profundo, entendiéndose por localización superficial, a la visibilidad externa del cisticerco; y profunda, a los hallazgos de cisticercos cuando se realizan cortes longitudinales y transversales del encéfalo (Burga, 1999).

Algunos estudios han demostrado que la respuesta del sistema inmune del cerdo contra el agente invasivo es de tipo humoral, observándose gran cantidad de células mononucleares y eusinófilos, y la co-localización de el MCH-II con linfocitos B, monocitos/macrófagos formando una reacción granulomatosa (Londoño *et al.*, 2002), y que los anticuerpos aparecen más tempranamente en cerdos infectados con oncósferas que en infecciones con posoncósferas (Rojas., *et al* 1999).

3.5 DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico de la cisticercosis porcina se han probado diferentes técnicas, las cuales de acuerdo a su grado de sensibilidad y especificidad se han descartado o aprobado para su utilización en trabajos epidemiológicos. Entre las más utilizadas tenemos.

3.5.1 Examen premortem o de lengua. En el diagnóstico premortem se realiza un examen visual minucioso de la lengua (González *et al.*,1990). También se examinan los ojos y las axilas, aunque este procedimiento es muy laborioso, la localización del cisticerco en la lengua, muchas veces cerca de la mucosa, es por

lo general fácilmente visible y palpable; debe enfatizarse que la ausencia de cisticercos en la lengua no descarta el diagnóstico, ya que los cisticercos pueden estar en otras localizaciones como el ojo, músculos, corazón, cerebro, etc. (OPS/OMS,1994).

3.5.2 Examen postmortem o necropsia. Este diagnóstico postmortem se realiza en donde se comercializa la carne de cerdo (en la canal), y consiste en hacer cortes en el cuerpo del animal para observar la presencia o no de cisticercos. Pero no hay uniformidad de criterios, en cuanto al lugar del corte, extensión y profundidad del mismo. La práctica más común, es realizar cortes en los músculos del brazuelo derecho, ancóneos y tríceps; algunos cortan los músculos maseteros. Conviene examinar las vísceras torácicas y abdominales, sobre todo el corazón por ser un órgano que con frecuencia está parasitado (OPS/OMS, 1994).

La inspección veterinaria de la carne detecta un bajo número de las canales infectadas con cisticercos y las canales inspeccionadas a menudo, son tomadas del sector de la población que tiene menos probabilidad de estar infectada. En las canales donde se detecta un sólo cisticerco en la inspección veterinaria de mataderos, probablemente contienen quistes viables en otras partes, por ello esas canales deben ser decomisadas para ser procesadas en lugar de eliminar sólo el cisticerco (Ccama, 2001).

3.5.3 Métodos de diagnóstico serológicos. El diagnóstico serológico se basa fundamentalmente en la detección de anticuerpos estimulados por los diferentes estadios del parásito y en menor medida en la detección de antígenos parasitarios (OPS/OMS, 1994). En la actualidad los métodos serológicos con fines investigativos que más se utilizan para el diagnóstico de la cisticercosis porcina son el EITB (enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay) y el ensayo inmunoenzimático ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Aunque variantes

de éste último como el Dot-ELISA y el ELISA de captura también son utilizados (Tinoco *et al.*, 2004).

3.5.3.1 Inmunoelectrotransferencia ligada a enzima (EITB) o westernblot. La prueba de EITB para el diagnóstico de la cisticercosis porcina emplea una fracción enriquecida de glicoproteína que se obtiene al purificar un extracto crudo del cisticerco por cromatografía con lentil-lectina. Las glicoproteínas de esta fracción se separan por electroforesis de acrilamida y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, se corta en tiras de 3 mm de ancho, se incuba con una muestra de suero y por ensayo inmunoenzimático se revelan las bandas específicas para cisticercosis porcina (Tsang *et al.*, 1989). El uso de la electroinmunotransferencia (EITB) para la determinación de anticuerpos anticisticercos se ha constituido en una de las mejores herramientas disponibles hasta el momento para la identificación de individuos positivos en condiciones de campo (Aguduelo y Palacios, 2003); además, cuando se utilizan antígenos purificados la prueba es altamente específica y sensible, y no presenta reacciones cruzadas (García *et al.*, 2001). Sin embargo su disponibilidad, alta especificidad y sensibilidad contrasta con su alto costo (Flisser *et al.*, 2006).

3.5.3.2 Ensayo inmunoenzimático ELISA. El ensayo inmunoenzimático ELISA se basa en la fijación del antígeno en una base sólida el cual reacciona con el anticuerpo que está presente en las muestras de los sueros problemas, este a su vez reacciona con un anticuerpo específico, el cual está unido covalentemente a una enzima y finalmente se visualiza la reacción mediante la adición de un sustrato enzimático.

En la actualidad el ensayo inmunoenzimático ELISA se ha constituido en una de las herramientas más utilizadas para el diagnóstico de la cisticercosis porcina. A pesar de no ser altamente específico y sensible como el EITB y tener reacciones cruzadas con otros helmintos (González *et al.*, 1993), esta prueba es generalmente

segura, rápida y simple, no requiere equipos costosos y sofisticados y puede ser utilizada por personas con poca experiencia en métodos inmunodiagnósticos (Sloan *et al.*, 1995; Hancock *et al.*, 2003).

La baja sensibilidad y especificidad es debida a que el antígeno que se emplea es un extracto crudo o fluido vesicular del cisticerco (Giraldo *et al.*, 2000). Sin embargo, cuando se trabaja con fracciones de glicoproteínas semipurificadas simultáneamente disminuye la posibilidad de obtener reacciones cruzadas con otras entidades parasitarias y permite obtener una alta especificidad y sensibilidad (Ito *et al.*, 1998; Giraldo *et al.*, 2001). Para estos fines el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Tropical de la Universidad INCCA de Colombia ha venido evaluando el comportamiento diagnóstico de fracciones polipeptídicas obtenidas a partir de extractos crudos del estado larval del metacéstodo de *Taenia solium* con sueros porcinos mediante el ensayo de ELISA, donde ha encontrado que fracciones de peso molecular de 29, 32, 41, 53, 61 y 64 kDa presentan rangos de especificidad y sensibilidad cercanos al 100%. Hasta el momento la fracción de 53 kDa es la que mejor comportamiento inmunológico ha tenido debido a su alta especificidad y sensibilidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) así como también la de no presentar reacciones cruzadas.

En la tabla 1, se muestra la sensibilidad (S), especificidad (E), VPP, VPN y la reactividad antigénica (RA) de la fracción de 53 KDa y de otras fracciones antigénicas obtenidas y valoradas por este laboratorio.

En las tablas 2 y 3 se muestran los resultados de la evaluación de reacciones cruzadas contra algunos protozoarios y helmintos de las fracciones de 29,53,66,77 y 92 KDa del metacestodo de *Taenia solium*.

Tabla 1. Valoración de la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativos (VPN) y reactividad antigénica (RA) de las fracciones 29,35,53,66,77 y 92 kDa del metacéstono de *Taenia solium* Fuente: Giraldo *et al* En: Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. Vol. 16, No 2 (2004); p 415.

FRACCIONES	SENSIBILIDAD %	ESPECIFICIDAD %	VPP %	VPN %	Promedio aritmético absorbancia sueros positivos(RA)	Promedio aritmético absorbancia sueros negativos
Extracto total	76.6	70	71.87	75	0.653	0.480
29 kDa	100	96.6	96.7	100	1.34	0.23
35 kDa	96.6	93.3	93.5	96.5	1.16	0.20
53 kDa	95.08	100	100	92.1	0.787	0.393
66 kDa	100	100	100	100	0.744	0.447
77 kDa	100	100	100	100	1.175	0.508
92 kDa	100	100	100	100	0.761	0.370

Tabla 2. Serología de sueros para reacciones cruzadas de las fracciones de 29, 53, 66, 77 y 92 kDa. Protozoos

FRACCIÓN (KDA)	IODAMOEBAS BUTSCHLI	ENTAMOEBAS HYSTOLITICA	ENDOLIMAX NANA	TOXOPLASMA GONDII	GIARDIA LAMBLIA	ENTEROBIUS VERMICULARIS	ENTAMOEBAS COLI
29	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-
77	-	-	-	-	-	-	-
92	-	-	-	-	-	-	-
Extracto total	-	-	-	-	-	-	+

Tabla 3. Serología de sueros para reacciones cruzadas de las fracciones de 29, 53, 66, 77 y 92 kDa. Helmintos

FRACCIÓN (KDA)	HYMENOLEPIS NANA	ASCARIS LUMBRICOIDES	TAENIA SAGINATA	TAENIA SOLIUM	STRONGYLOIDES STERCOLARIS	TRICHURIS TRICHIURA
29	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-
77	-	-	-	-	-	-
92	-	-	-	-	-	-
Extracto total	+	+	+	+	+	+

3.6 EPIDEMIOLOGÍA

La cisticercosis por *Taenia solium* es una enfermedad zoonótica común en países en desarrollo y un grave problema de salud pública a nivel mundial (Tinoco *et al.*, 2004). Estudios epidemiológicos arrojan resultados de prevalencias que varían entre países, como consecuencia de la diversidad de protocolos y metodologías empleadas, así como de la falta de vigilancia sanitaria de cada país (Giraldo, 2005). En zonas rurales de Tanzania se reportan prevalencias que varían entre 3.2 y 46.7% (Ngowi *et al.*, 2004).

En países de América Latina y el Caribe donde el sacrificio clandestino de cerdos y sin inspección y control sanitario es muy elevado, los estudios arrojan rangos de prevalencias variados (OPS/OMS, 1994). Para el caso de Perú, se reportan niveles de seroprevalencias para zonas rurales las cuales varían entre 42.3 y 75.0% (García *et al.*, 2003). En estudios realizados en el Noreste de Brasil se reportan prevalencias de entre 4.4, 3.2 y 23.5% para Salvador, Santo Amaro y Jaquié respectivamente (Sakai *et al.*, 2001). En regiones del Ecuador las prevalencias de cisticercosis porcina se encuentran entre 5.9 y 12.0% (Jiménez, 1976; Benítez, 1995). En zonas rurales de Honduras se han encontrado prevalencias de cisticercosis porcina de hasta 27.1% (Sakai *et al.*, 1998). México,

país que más estudios ha realizado sobre cisticercosis porcina informa que las prevalencias de esta infección parasitaria en zonas rurales muy apartadas es hasta el 13% (De Aluja y Villalobos,2000).

De igual manera en Colombia se reportan prevalencias que varían entre las distintas regiones del país, por ejemplo, en el municipio de Coyaima, departamento del Tolima, (región central del país) Serrano *et al.* (1992) reporta una prevalencia Total del 25.64%; en la Costa Norte, algunos estudios como el realizado en el departamento de Córdoba, en los municipios de Moñitos y Los Córdoba en los cuales Quintero *et al.* (2000) informa de una prevalencia Total de 13.33%. Otros estudios realizados en Tunja departamento de Boyacá (región oriental) Andrade *et al.* (2003). reporta una prevalencia Total de 8.66%, Marín *et al.* (2004). en Calarcá, departamento del Quindío informa de una prevalencia de 12.6%. Investigaciones similares realizadas por Patarroyo *et al.* (2004) en la Planta de Beneficio de Ganado “Carlina” Ibagué, Tolima, reportan una prevalencia de 10.5%. En el departamento de Sucre Acuña y Caldera (2006) reportan una prevalencia de neurocisticercosis de 28.7% en la población de Sabanas de Pedro. Figura 7.



Figura 7. Epidemiología de la cisticercosis porcina en Colombia

Fuente: Revista Científica UNINCCA

3.7 IMPORTANCIA ECONÓMICA

El impacto económico de la cisticercosis porcina sólo ha sido calculado en un número reducido de países, debido a que en muchos casos no se tiene una adecuada información sobre la prevalencia real de la infección, sin embargo, las pérdidas económicas causadas por ésta zoonosis fueron calculadas en algunos países y en otras instancias los costos fueron significativos (González, 1993).

En 10 países del África Central y Occidental, las pérdidas económicas ocasionadas por ésta enfermedad por año son alrededor de 25 millones de euros. En Sur América la cisticercosis porcina produce pérdidas económicas anuales alrededor de 420 millones de dólares (Pinto *et al.*, 2002).

En México, la cisticercosis porcina es responsable de grandes pérdidas económicas en la producción porcina nacional y más de 20 millones de dólares al año por hospitalización y costos de tratamientos para humanos con cisticercosis (Murrell, 1991). En Perú, se demostró que de 65 TM de carne de porcino que se comercializaron en 1987, el 55% provenía de matanzas clandestinas, y de éstos el 40% (11700 TM) estaba infectado con cisticercosis, en este país la cisticercosis porcina causa pérdidas económicas anuales por más de 5 millones de dólares (González, 1993).

En Colombia el Ministerio de Salud ha reportado el decomiso de 10000 a 11000 cerdos por año, correspondientes aproximadamente a 440000 Kg. de carne (OPS/OMS, 1994) equivalentes a pérdidas económicas cercanos a los 2000 millones de pesos.

En el desarrollo de la presente investigación se pudo constatar que cuando resulta un cerdo positivo en los sitios de sacrificios clandestinos de la zona, se concerta con el propietario un nuevo precio que puede ser hasta el 50% menos del valor inicial del animal o, es devuelto en definitivo al propietario. En ambos casos se

pone en riesgo la salud de quienes adquieren los porcinos para comercializarlos como carne para consumo ya que la misma se ofrecerá a precios muy bajos.

3.8 TRATAMIENTO DE LA CISTICERCOSIS PORCINA

El tratamiento ideal para la cisticercosis porcina se puede describir como aquel que mediante un mínimo de manipulación del animal consiga el 100% de inactivación de los quistes sin ningún efecto adverso y bajo costo (Falcón, 1995).

Estudios in Vitro han demostrado la efectividad del Praziquantel y del Albendazol Sulfoxido, aunque su efectividad va a depender de las concentraciones empleadas y del tiempo de exposición (Palomares *et al.*, 2004). También se ha demostrado que el Oxfendazol es un cestocida potencialmente efectivo contra la cisticercosis porcina porque además de combatir la infección protege al cerdo contra futuras reinfecciones (González *et al.*, 2001).

3.9 CONTROL Y PREVENCIÓN

La crianza de cerdos tecnificada en condiciones básicas de higiene y restricción, resulta una importante medida de intervención para disminuir la cisticercosis porcina en comunidades rurales (Vázquez *et al.*, 2001), además es necesario la introducción de información técnica y realizar pequeñas modificaciones tecnológicas dentro de la crianza tradicional de cerdos en áreas donde la cisticercosis porcina es endémica (Pinto *et al.*, 2002). La utilización de péptidos sintéticos como vacuna ha demostrado reducir hasta en un 98.7% la viabilidad de los cisticercos disminuyendo considerablemente la tasa de infección (Huerta *et al.*, 2002). El desarrollo de vacunas utilizando antígenos de diferentes estadios del parásito también puede ser un método eficaz (Flisser *et al.*, 2004; González *et al.*, 2005b).

4. METODOLOGÍA

4.1 LUGAR DE ESTUDIO

El estudio se realizó en el municipio de Galeras, departamento de Sucre, durante los meses de octubre y noviembre del 2005. Este municipio se encuentra ubicado en la zona centro del departamento de Sucre, situado a unos 72 Kms aproximadamente de la capital, Sincelejo, a 9° 12' 48" de Latitud Norte y 75° 0.5' 48" de Longitud Oeste del meridiano de Greenwich. En esta zona predomina un clima de bosque seco tropical, con una precipitación promedio anual de 3200 mm y con una temperatura alrededor de los 32 °C. Las actividades económicas de mayor importancia son la agricultura, ganadería extensiva y cría de animales domésticos sin ninguna tecnificación.

4.2 TIPO DE ESTUDIO Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Se realizó un estudio descriptivo y transversal. Se tomó como universo el total de cerdos registrados en la UMATA, Seccional Galeras. Tomando en cuenta una población de 2560 cerdos (censo 2004) de traspatio en todo el municipio de Galeras, se estimó el tamaño de la muestra, basándose en la fórmula para estudios descriptivos (Cox y Cochran, 1976) (**Anexo A**). La fórmula calculó un tamaño de muestra representativa para la población porcina del municipio de Galeras de 182 cerdos aproximadamente, con un nivel de confianza del 95% y una precisión del 4%.

4.3 TRABAJO DE CAMPO

Se realizaron visitas previas a las casas particulares donde se sacrificaban y comercializaban los cerdos, con el propósito de explicar el objetivo de la investigación y las implicaciones de ésta. Se invitó a participar voluntariamente a cada una de estas personas mediante la firma de un consentimiento informado (**Anexo B**).

4.3.1 Diagnóstico de cisticercosis porcina por examen premortem

4.3.1.1 Examen de lengua. Previamente al sacrificio de los cerdos, se procedió a realizar la respectiva palpación de los nódulos y/o identificación visual de los cisticercos. Para ello se sujetó el animal, se le introdujo un trozo de madera en forma transversal en el hocico para mantenerlo abierto y se le jaló la lengua utilizando una tela. Los criterios utilizados para el diagnóstico fueron: a) la observación de los quistes en la superficie de la lengua, b) la palpación de la lengua y su base, y c) la observación de los cisticercos o rasgos que sugieran que fueron extraídos (práctica muy común) (González., *et al* 1993). También se examinaron los ojos y las axilas.

4.3.2 Diagnóstico de cisticercosis porcina por examen postmortem

4.3.2.1 Inspección por necropsia. Inmediatamente después del sacrificio del animal se procedió a realizar cortes en los músculos (serrato dorsal, maseteros, diafragma, corazón, etc.) y vísceras (pulmón, hígado y riñones) para constatar la presencia de cisticercos. Este examen se realizó de manera cuidadosa para no dejar pasar desapercibidos algunos cisticercos en la canal, si fuere el caso de una infección leve.

4.3.3 Obtención de muestras sanguínea. Se tomaron entre 5 y 8 ml de sangre a cada animal en el momento de la estocada, previa desinfección con alcohol yodado en el sitio de la punción. Los cuales fueron envasados en tubos de vidrio estériles sin anticoagulante, previamente rotulados. Las muestras de sangre contenidas en los tubos se dejaron en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente para retracción del coagulo.

Posteriormente al diagnóstico premortem, postmortem y obtención de la muestra sanguínea de cada animal, a éstos se les asignó un código de identificación y se les realizó una encuesta que contenía los siguientes datos: peso, edad, sexo, raza, procedencia, destino (posibles factores de riesgos) y resultado de examen premortem y postmortem (**Anexo C**).

4.3.4 Transporte y procesamiento de las muestras. Recolectadas todas las muestras se conservaron y transportaron en frío en nevera de icopor para ser procesadas en el hospital del municipio de Galeras, donde se centrifugaron a 2500 rpm por 15 minutos. El suero obtenido fue alicuotado en tubos eppendorf de 1.5 ml previamente rotulados y se conservaron en frío hasta su posterior análisis.

4.4 TRABAJO DE LABORATORIO

Los procedimientos para la obtención y separación de proteínas, así como los ensayos serológicos se llevaron a cabo en las instalaciones del laboratorio de investigación en Microbiología y Parasitología Tropical de la Universidad INCCA de Colombia.

4.4.1 Obtención del antígeno total (AgT). El AgT fue obtenido a partir de cisticercos viables disertados de un cerdo positivo por examen postmortem

durante la fase de campo proveniente del municipio de Galeras, cuyo protocolo se presenta en el **Anexo D**.

4.4.2 Obtención de la fracción polipeptídica de 53 kDa por electroforesis de poliacrilamida-bisacrilamida (SDS-PAGE) y elusión pasiva. Se montó un gel preparativo denaturante parcial al 10% (**Anexo E**), al cual se le realizó una precorrida para eliminar las impurezas iónicas a 100 voltios por 30 minutos; posteriormente se adicionó 490 μ l de muestra en un macropozo, de los cuales 315 μ l correspondían al AgT y 175 μ l al Buffer de carga, con un voltaje de 100.

Todo el proceso fue desarrollado con refrigeración por reflujo. Después de desmontar el gel se procedió a realizar cortes transversales al gel separador de aproximadamente 1,5 mm de espesor y del ancho del gel, estas tiras de gel fueron suspendidas individualmente en tubos eppendorf con 500 μ l de Buffer PBS-Tween PH 7.2 (**Anexo F**), con el fin de eluir las proteínas y recuperarlas del trozo de gel.

Seguidamente se maceró hasta una completa homogenización y se centrífugo a 13000 rpm por 30 minutos. Posteriormente se tomaron 9 μ l del sobrenadante y 5 μ l del Buffer de carga y se procedió a realizar otra electroforesis con los eluidos y los marcadores de peso molecular entre 7 y 205 kDa, bajo las mismas condiciones de la electroforesis preparativa. Terminada la corrida electroforética se desmontó el gel y se coloreó para comprobar la existencia de las fracciones antigénicas con una solución coloreadora y se decoloró con una solución decolorante (**Anexo G**), (Giraldo *et al.*, 2000).

Posteriormente se calculó el Rf (Tasa de migración) a cada una de las bandas presentes en el gel, para ubicar topográficamente a cada una de las fracciones pertenecientes al AgT y en especial la de 53 kDa por ser de nuestro interés. Obtenidos los valores de Rf se procedió a calcular el peso molecular (PM) de cada

fracción, empleando la ecuación de la regresión potencial de la curva de calibración de PM Vs Rf

$$Y = 176.09 \phi^{-2.7163x}$$

Fuente: Giraldo *et al*, 2000.

4.4.3 Medición de la concentración proteica de la fracción de 53 kDa. La cuantificación de la proteína de 53 kDa fue realizada por el método Bradford (Bradford,1976). Se empleó un patrón con una concentración de 50 ug/ml de albúmina sérica bovina fracción V (BSA), posteriormente se tomaron 40 ul de cada fracción eluida y se le adicionaron 2 ml del reactivo de Bradford (**Anexo H**), luego se procedió a realizar la lectura de los valores de absorbancia en un espectrofotómetro a 560 nm. Con los datos se calibró la curva de concentración vs. absorbancia y se calculó la ecuación correspondiente que permitió la interpolación de los valores de absorbancia de las muestras determinándose la concentración de cada una de las fracciones, con especial interés por la de 53 KDa.

4.4.4 Serología. La detección de anticuerpos específicos del tipo IgG fue realizado utilizando la prueba de inmunoensayo indirecto ELISA, previamente estandarizado por el equipo de investigación en Microbiología y Parasitología Tropical de la Universidad INCCA de Colombia.

4.4.5 Controles. Para el desarrollo de la prueba de ELISA fueron utilizados los respectivos controles positivos, provenientes de sueros porcinos positivos para cisticercosis por examen premortem, postmortem y ensayos serológicos de ELISA

de una región endémica del departamento del Cauca, y negativos por examen premortem, necropsia y serológicamente de una región no endémica del departamento del Quindío.

4.4.6 Técnica de ensayo inmunoenzimático (ELISA) para el diagnóstico de cisticercosis porcina. La sensibilización de la placa de ELISA se realizó tomado como concentración de antígeno (fracción de 53 KDa) de 0.2 µl/ml, diluidos en buffer de cobertura 0.2 M pH 9.6 (**Anexo I**), se adicionaron 100 µl de antígeno por pozo y se procedió a la incubación de la placa durante toda la noche a 4° C. Se lavó la placa 3 veces con buffer PBS – Tween 20 al 0.1 % pH 7.4 por 5 minutos cada vez. Se bloqueó la placa con 200 µl por pozo con albúmina sérica bovina 0.1 % fracción V en buffer PBS – Tween 20 y se incubó a 37° C por 1 hora, se repitió el proceso de lavado anterior y se adicionó 100 µl por pozo de los sueros problemas en una dilución de 1/100 en buffer PBS – Tween 20 y se incubó a 37° C por 1 hora. Nuevamente se realizó el proceso de lavado descrito antes y se agregó 100 µl de conjugado (Anti IgG porcina) marcada con peroxidasa en una dilución de 1/2500 en buffer PBS – Tween 20 y se incubó durante una hora a 37° C. Nuevamente se lavó la placa y se reveló adicionando 200 µl de la solución reveladora OPD (Sigma P 2903). Finalmente se frenó la reacción a los 10 minutos a temperatura ambiente, con 50 µl de HCL 2.5 N. Las muestras fueron analizadas por duplicado, incluido un blanco. La lectura de los valores de absorbancia se realizó a 492 nm en un lector de ELISA Multiskan Plus MKII.

4.4.7 Interpretación de la prueba. Se consideró positiva toda densidad óptica igual o superior al punto de corte, el cual se ha definido como el punto de cruce entre el promedio de las lecturas de los sueros controles no reactivos (CN) más dos desviaciones estándar (DS) (Vargas, 2004; Medina, 2004).

$$VC = CN + 2 DS$$

Las fórmulas utilizadas para determinar la seroprevalencia según la prueba, la prevalencia corregida y cálculo de prevalencia por examen premortem y postmortem se presentan en el anexo (J).

4.4.8 Análisis estadístico. El análisis estadístico se realizó empleando el paquete estadístico SPSS (Chicago, IL). Los resultados de seroprevalencia se presentarán con intervalos de confianza del 95%. El efecto de las variables: peso, edad, sexo, raza, procedencia, como (posibles) factores de riesgos sobre la presencia de anticuerpos anticisticercos, expresadas como resultado a la prueba serológica de ELISA, se evaluó haciendo uso de la prueba de Ji – cuadrado (χ^2), adicionalmente se utilizó la prueba de regresión logística, la cual no sólo determina la presencia de asociación entre las variables en estudio sino que también la cuantifica, lo que permite tener resultados más exactos.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se estudió una muestra de 188 individuos (n = 188). De estos, 105 (55.9 %) pertenecían al género masculino y 83 (44.1 %) al género femenino. El rango de edad se estimó entre 3 y 30 meses; el mayor porcentaje de cerdos estuvo entre 4 – 7 meses. El peso osciló entre 17 y 170 Kg. El rango de peso más abundante fue el de 30 – 59 Kg. 159 (84.6 %) fueron de raza criolla y 29 (15.4 %) de raza yelsi. En cuanto a la procedencia de los animales 112 (59.6 %) fueron de traspatio y 76 (40.4 %) fueron de origen rural (casas y fincas aledañas al municipio). Tabla 4.

Tabla 4. Características descriptivas de la población de estudio. Galeras – Sucre.

VARIABLE		N	%
Sexo	Macho	105	55,9
	Hembra	83	44,1
	Total	188	100
Edad (meses)	Menor de 4	2	1,1
	4 - 7	98	52,1
	8 -11	64	34,0
	12 o más	24	12,8
	Total	188	100
Pesos (kg)	Menor de 30	8	4,3
	30 - 59	111	59,0
	60 - 89	53	28,2
	90 o más	16	8,5
	Total	188	100
Raza	Criolla	159	84,6
	Yelsi	29	15,4
	Total	188	100
Procedencia	Traspatio	112	59,6
	Rural	76	40,4
	Total	188	100

5.2 EVALUACIÓN FÍSICA : EXAMEN PREMORTEM Y POSTMORTEM

Por el método de evaluación premortem, ninguno de los 188 porcinos diagnosticados resultó positivo, ya que en ninguno de ellos se pudo evidenciar la presencia del estado larval de la *Taenia solium*, lo cual representa una prevalencia de 0.0 % (0/188) por examen premortem (Figura 8). Sin embargo cuando se les realizó el examen postmortem, se pudo diagnosticar un porcino como positivo al encontrar nódulos o larvas de *Taenia solium* a nivel de órganos y tejidos, con infección masiva en el corazón (Figura 9). Mediante este último examen se obtuvo una prevalencia de cisticercosis del 0,5% (1/188) para el municipio de Galeras (Figura 10), siendo el individuo de género femenino y de procedencia municipal (traspatio).

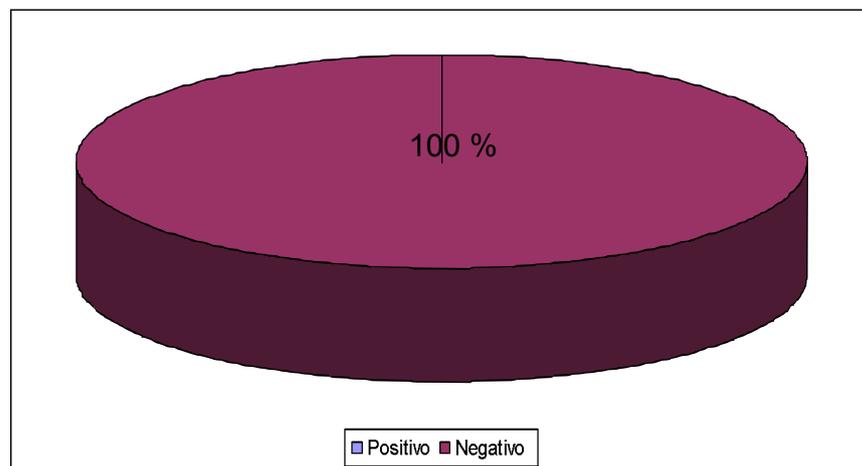


Figura 8. Prevalencia de cisticercosis porcina por examen premortem para el municipio de Galeras.

Fuente: El autor.

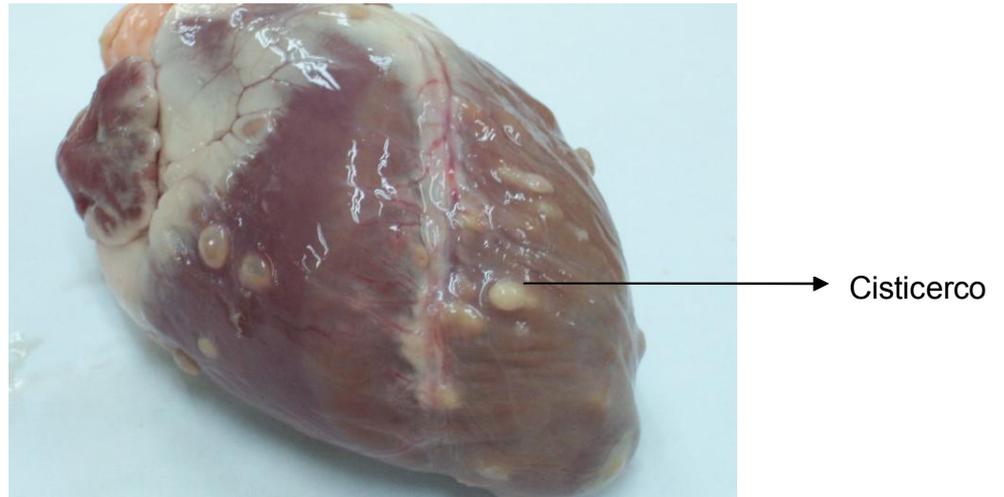


Figura 9. Cisticercosis muscular: Múltiples larvas de *Taenia solium* en el corazón de un cerdo positivo por examen postmortem.
Fuente: El autor.

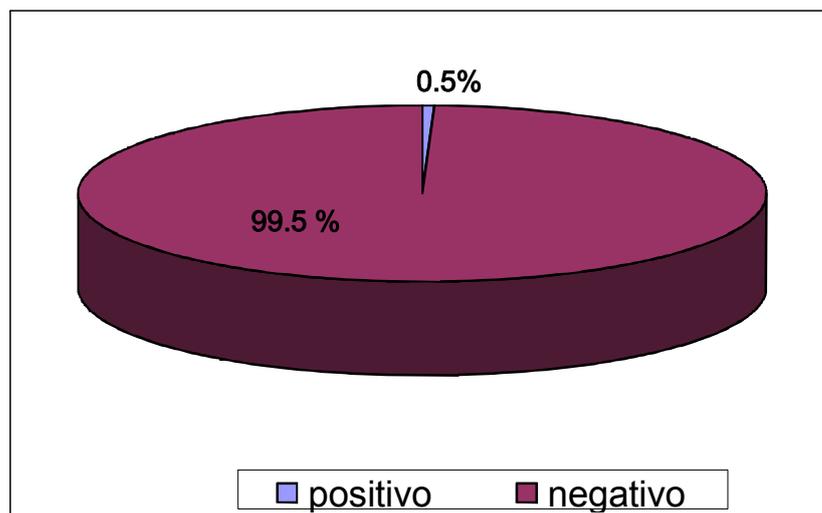


Figura 10. Prevalencia de cisticercosis porcina por examen postmortem para el municipio de Galeras.
Fuente: El autor.

5.3 OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN DE 53 KDA POR ELECTROFORESIS (SDS-PAGE) Y ELUSIÓN PASIVA

A partir del extracto antigénico total de larvas de *Taenia solium* con concentración de 14 mg/ml, empleando la técnica de electroforesis SDS-PAGE, se pudo separar los diferentes polipéptidos del antígeno total, revelando un complejo de bandas proteicas de diferentes pesos moleculares, referenciadas por patrones de pesos moleculares altos y bajos los cuales oscilaban entre 7 y 205 KDa.

De esta manera se pudo localizar topográficamente la fracción de 53 kDa (Figura 11) de interés para este estudio.

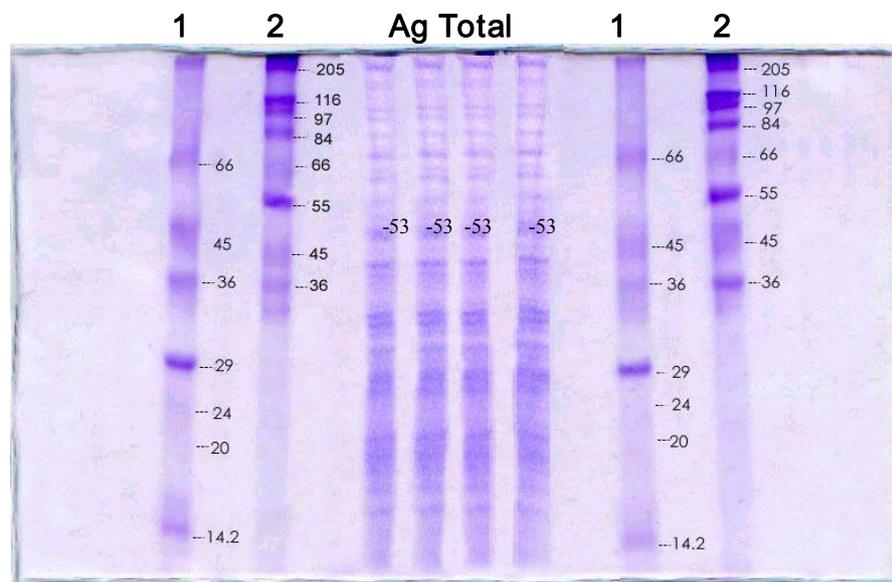


Figura 11. Gel de electroforesis al 10 % con el antígeno total donde se muestra la fracción de 53 KDa. 1. Marcadores de peso Molecular bajo. 2 Marcadores de peso Molecular alto

Fuente: El autor, Bogota, 2006.

A partir de esta electroforesis se tomó el fragmento de gel que contenía la fracción de 53 kDa, conformada por una sola banda, a este fragmento se le aplicó la técnica de elusión pasiva para semipurificar la fracción (Figura 12).

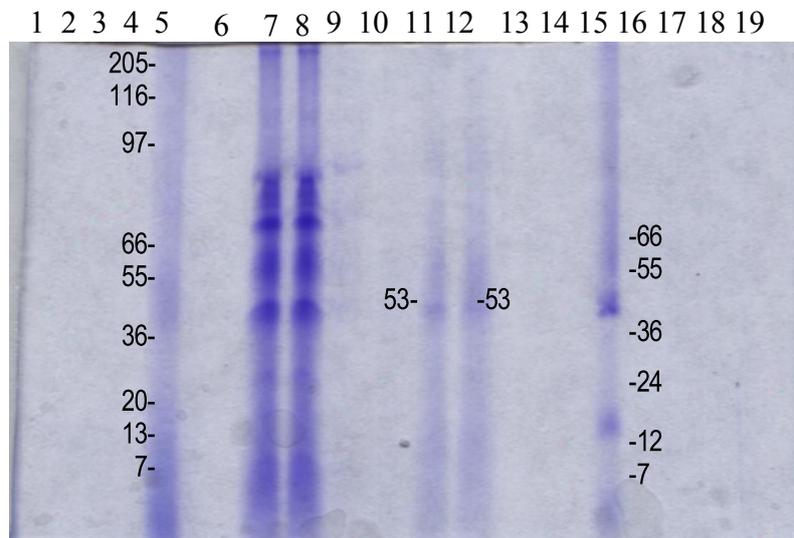


Figura 12. Gel de electroforesis al 10% con la fracción de 53 KDa. 5. Pesos moleculares altos. 7 y 8 Ag Total. 11y 12 Fracción de 53 kDa. 15 Pesos moleculares bajos

Fuente: El autor.

5.4 CUANTIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA DE 53 KDA POR EL MÉTODO DE BRADFORD

El método de Bradford permitió la cuantificación de la concentración de la fracción proteica de 53 KDa obtenida por elusión pasiva, lográndose obtener un valor de concentración de 24.53 $\mu\text{g/ml}$.

5.5 SEROPREVALENCIA DE CISTICERCOSIS EN PORCINOS MEDIANTE EL INMUNOENSAYO ELISA CON LA FRACCIÓN DE 53 KDA

El punto de corte para el inmunoensayo ELISA con la fracción de 53 KDa, utilizando sueros porcinos se estableció en 0,533 (Giraldo *et al.*, 2000).

En el diagnóstico por la prueba de inmunoensayo ELISA, 47 de 188 sueros analizados presentaron anticuerpos anticisticercos positivos (Figura 13 y 14), indicando una seroprevalencia de laboratorio del 25.0%, que al ser corregida teniendo en cuenta la sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica (100% y 99.1% respectivamente) fue de 24.32%, para el municipio de Galeras (Figura 15).

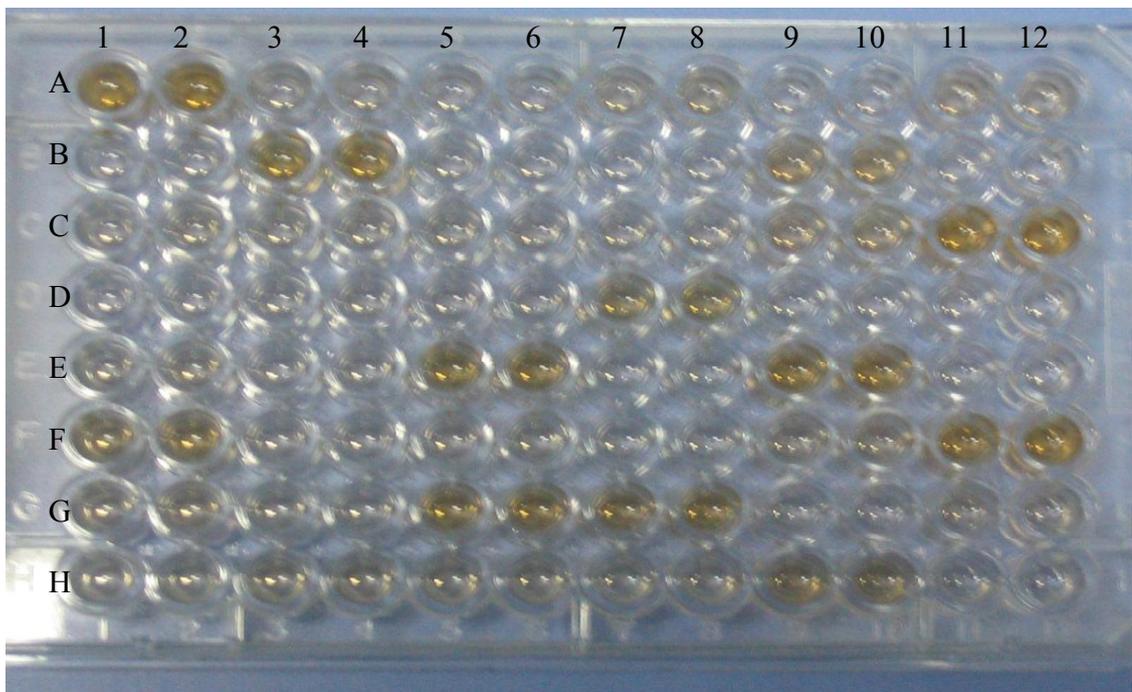


Figura 13. Niveles de IgG total en la población objeto de estudio. Fotografía del microplato con los resultados obtenidos. Pozos A1 – A2: Control positivo, Pozos A3 - A4: Control negativo, Pozos H11 – H12: Blanco, Pozos A5 – H10: Muestras problemas.

Fuente: El autor.

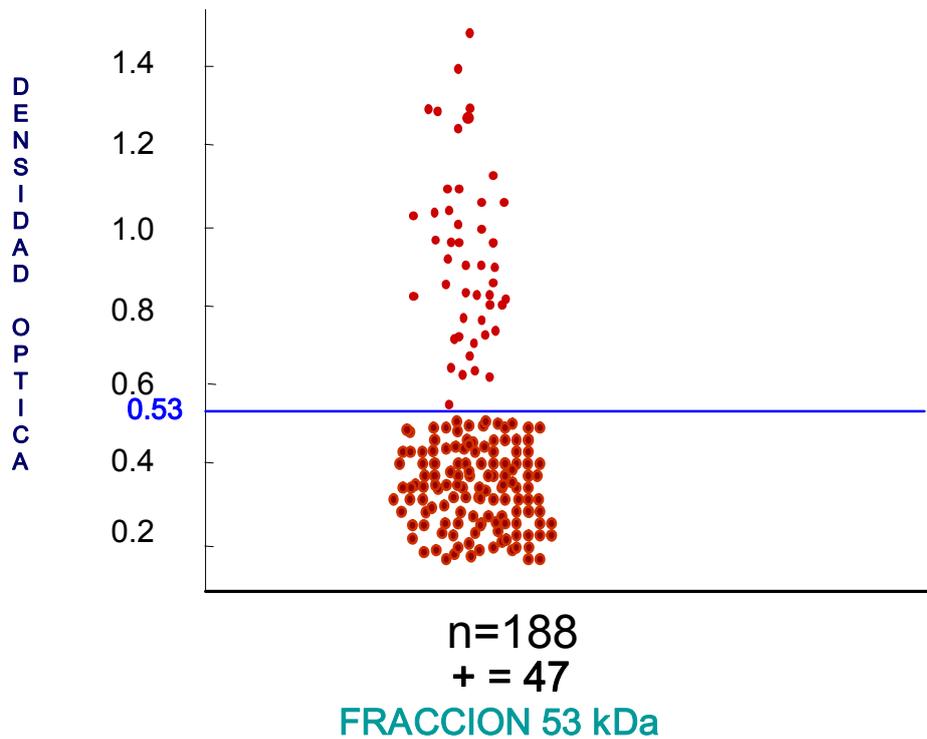


Figura 14. Niveles de IgG total en la población objeto de estudio. Distribución de los valores de absorbancia de los sueros en la población objeto estudio evaluada mediante la técnica de ELISA.

Fuente: El autor.

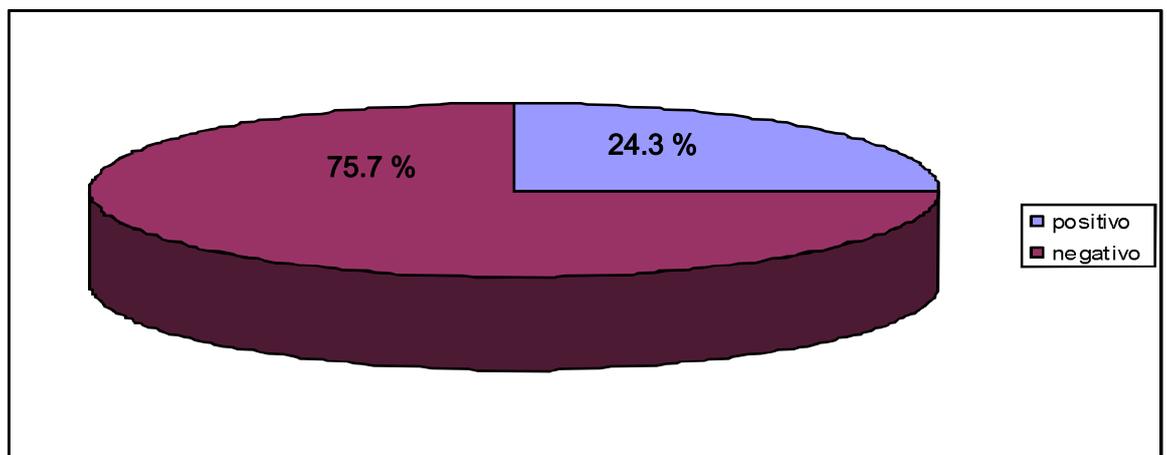


Figura 15. Seroprevalencia de cisticercosis porcina para el municipio de Galeras.

Fuente: El autor.

De los 47 individuos que resultaron positivos para la prueba de ELISA 17 (9.04%) fueron del género masculino y 30 (15.96%) del género femenino. 41 (21.8%) fueron de raza criolla y 6 (3.19%) de raza yelsi; 31 (16.49%) provenían de traspatio y 16 (8.51 %) de origen rural (Tabla 5-7).

Tabla 5. Relación entre los resultados de la prueba serológica de ELISA contra la fracción de 53 kDa y el sexo de la población de estudio. Galeras – Sucre.

SEROLOGÍA (ELISA)	MACHO		HEMBRA		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%
Positivos	17	9.04	30	15.96	47	25.0
Negativos	88	46.80	53	28.19	141	75.0
Total	105	55.84	83	44.15	188	100

Tabla 6. Relación entre los resultados de la prueba serológica de ELISA contra la fracción de 53 kDa y la Raza de la población de estudio. Galeras – Sucre.

SEROLOGÍA (ELISA)	CRIOLLO		YELSI		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%
Positivos	41	21.8	6	3.19	47	25.0
Negativos	118	62.76	23	12.23	141	75.0
Total	159	84.56	29	15.42	188	100

Tabla 7. Relación entre los resultados de la prueba serológica de ELISA contra la fracción de 53 kDa y la procedencia de la población de estudio. Galeras – Sucre.

SEROLOGÍA (ELISA)	RURAL		TRASPATIO		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%
Positivos	16	8.51	31	16.49	47	25.0
Negativos	60	31.91	81	43.08	141	75.0
Total	76	40.42	112	59.57	188	100

El grupo etáreo con mayor frecuencia de anticuerpos anticisticercos fue el de 4-7 meses; con respecto a la variable peso, se encontró que los individuos que presentaron mayor frecuencia de anticuerpos anticisticercos oscilaron entre 30-59 Kg. (Tabla 8-9).

Tabla 8. Relación entre los resultados de la prueba serológica de ELISA contra la fracción de 53 kDa y los grupos etáreos de la población de estudio. Galeras – Sucre.

GRUPOS ETÁREOS	SEROPOSITIVIDAD (ELISA)					
	Positivos		Negativos		Total	
	n	%	n	%	n	%
Menor a 4 meses	0	0	2	1.06	2	1.06
Entre 4 - 7 meses	23	12.23	75	39.9	98	52.13
Entre 8-11 meses	16	8.51	48	25.53	64	34.04
12 meses o más	8	4.25	16	8.51	24	12.76
TOTAL	47	24.99	141	75.00	188	100

Tabla 9. Relación entre los resultados de la prueba serológica de ELISA contra la fracción de 53 kDa y los pesos de la población de estudio. Galeras – Sucre.

PESOS	SEROPOSITIVIDAD (ELISA)					
	Positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
Menor a 30 Kilos	2	1.06	6	3.19	8	4.25
Entre 30-59 Kilos	23	12.23	88	46.80	111	59.04
Entre 60-89 Kilos	16	8.51	37	19.68	53	28.20
90 Kilos o más	6	3.19	10	5.32	16	8.51
TOTAL	47	24.99	141	75	188	100

5.6 EVALUACIÓN DE POSIBLES FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA SEROPOSITIVIDAD DE LA CISTICERCOSIS PORCINA

El presente estudio mostró que existe una diferencia estadísticamente significativa con relación al género ($p=0.002$) (Tabla 10). Se encontró que entre los cerdos que fueron positivos para la prueba serológica de ELISA, la probabilidad de encontrar un individuo macho es 0.341 veces la probabilidad de encontrar uno hembra, en este sentido el género masculino se comporta como un factor protector para adquirir la enfermedad. El factor protector hace referencia a aquellos animales que tiene una menor probabilidad de ser infectados por causas externas. Siguiendo el mismo criterio, se encontró que la probabilidad de encontrar un individuo hembra infectado es 2.930 veces la probabilidad de encontrar uno macho, comportándose el género femenino como un factor de predisposición para contraer la enfermedad (Tablas 11). Al analizar la variable raza, se encontró que no existe una asociación estadística cuando se relacionó con la seropositividad ($p=0.560$); sin embargo se encontró una mayor proporción de cerdos de raza criolla seropositivos (Tabla 12). Así mismo cuando se analizaron factores asociados a la seropositividad, encontramos que no hay diferencia significativa, con respecto a la procedencia de los animales (rural o traspatio) ($p=0.303$); con los grupos etéreos ($p=0.412$; 0.613 ; 1.000 ; 0.313) o con el peso ($p=1.000$; 0.104 ; 0.303 ; 0.227) (Tablas 13-15).

Tabla 10. Tabla de contingencia para análisis de Chi – cuadrado entre seropositividad y el sexo de los individuos. Galeras - Sucre.

SEXO	ELISA POSITIVO		ELISA NEGATIVO	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Macho	17	36.17	88	62.41
Hembra	30	63.83	53	37.59
Total	47	100	141	100
Chi Cuadrado = 9.844		p= 0.002		

Tabla 11. Estimación de riesgo para el sexo de los animales. Galeras – Sucre.

CARACTERÍSTICA	VALOR	INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%	
		Inferior	Superior
Sexo macho			
Razón de las ventajas para Sexo MACHO	0.341	0.172	0.677
Sexo hembra			
Razón de las ventajas para Sexo HEMBRA	2.930	1.476	5.817

Tabla 12. Tabla de contingencia para análisis de Chi – cuadrado entre seropositividad y la raza de los individuos. Galeras – Sucre.

RAZA	ELISA POSITIVO		ELISA NEGATIVO	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Criollo	41	87.23	118	83.7
Yelsi	6	12.77	23	16.3
Total	47	100	141	100
Chi Cuadrado = 0.340		p= 0.560		

Tabla 13. Tabla de contingencia para análisis de Chi – cuadrado entre seropositividad y la procedencia de los individuos. Galeras – Sucre.

PROCEDENCIA	ELISA POSITIVO		ELISA NEGATIVO	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Traspatio	31	66	81	57.45
Rural	16	34	60	42.55
Total	47	100	141	100
Chi Cuadrado = 1.060		p= 0.303		

Tabla 14. Tabla de contingencia para análisis de Chi – cuadrado entre seropositividad y la edad de los individuos. Galeras – Sucre.

GRUPOS ETÁREOS	SEROPOSITIVIDAD (ELISA)					
	Positivos		Negativos		X ²	P
	n	%	n	%		
Menor a 4 meses	0	0.00	2	1.42	0.674	0.412
Entre 4 - 7 meses	23	48.94	75	53.2	0.256	0.613
Entre 8-11 meses	16	34.04	48	34.04	0.000	1.000
12 meses o más	8	17.02	16	11.35	1.019	0.313
TOTAL	47	100	141	100		

Tabla 15 . Tabla de contingencia para análisis de Chi – cuadrado entre seropositividad y el peso de los individuos. Galeras – Sucre.

PESOS	SEROPOSITIVIDAD (ELISA)					
	Positivos		Negativos		Chi cuadrado	P
	n	%	n	%		
Menor a 30 Kilos	2	4.26	6	4.26	0.000	1.000
Entre 30-59 Kilos	23	48.93	88	62.41	2.657	0.104
Entre 60-89 Kilos	16	34.04	37	26.24	1.060	0.303
90 Kilos o más	6	12.76	10	7.09	1.457	0.227
TOTAL	47	100	141	100		

5.7 REGRESIÓN LOGÍSTICA

El criterio para decidir si una variable representa un factor de riesgo mediante la prueba de regresión, es evaluando el nivel de significancia (debe ser menor de 0.05 para admitir que la variable influye en el modelo), los intervalos de confianza del Odds Ratio y el Odds Ratio (Radio de Oportunidad que ocurra el hecho), el

cual si es mayor a 1 indica que la variable en evaluación representa un factor de riesgo; si es igual a 1 la variable es indiferente, y si es menor a 1 indica que la variable del estudio se comporta como un factor protector. Siguiendo este criterio, el análisis de regresión logística confirma que la variable género masculino representa un factor protector para la enfermedad con un Odds Ratio menor a 1 (0.342). La tabla 16 muestra la cuantificación del riesgo con sus respectivos límites de confianza para las variables consideradas como posibles factores de exposición.

Tabla 16. Resultado de Odds Ratio a partir de la evaluación del efecto de las variables en estudio sobre la presencia de anticuerpos mediante la prueba de regresión logística.

VARIABLES	NIVEL DE SIGNIFICANCÍA	ODDS RATIO (OR)	IC DEL 95 % DEL OR	
			Limite Inferior	Limite Superior
Masculino	0.004	0.342	0.164	0.709
Yelsi	0.554	0.728	0.254	2.086
Traspatio	0.668	1.177	0.559	2.476
Edad 1	0.999	0.000	0.000	
Edad 2	0.352	1.989	0.467	8.466
Edad 3	0.522	1.489	0.440	5.043
Peso 1	0.391	0.367	0.037	3.635
Peso 2	0.134	0.313	0.068	1.429
Peso 3	0.517	0.647	0.173	2.419

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La comparación de los resultados obtenidos mediante la evaluación premortem y postmortem con valores de 0.0 % y 0.5 % respectivamente y los obtenidos con la prueba de ELISA utilizando la fracción de 53 kDa de 24.32 demuestran la poca confiabilidad e ineficacia que tienen estos dos tipos de exámenes directos como pruebas para el diagnóstico de la cisticercosis porcina en campo, destacando la importancia de las pruebas serológicas como el ensayo de ELISA por ser de alta especificidad y sensibilidad al momento de diagnosticar la cisticercosis porcina.

Sin embargo, estos métodos de diagnósticos directos aún se emplean en áreas rurales y centrales de sacrificios registradas como legales. Estos resultados son similares a los obtenidos por Sato *et al.*, (2003), en una región endémica de Tanzania donde el 76% de los cerdos positivos por inspección lingual y 34% de cerdos negativos por inspección de lengua y necropsia fueron positivos para la prueba de ELISA. En Colombia se han realizado estudios de seroprevalencia de cisticercosis porcina que han arrojado resultados similares como los obtenidos por Marín *et al.*, (2004) los cuales reportan una prevalencia de 1.3 % en examen premortem y postmortem y del 12.6 % con el examen serológico ELISA. De igual manera trabajos realizados por Giraldo, (2005), informa de una prevalencia de 0.28 % y 0.0 % por exámenes premortem y postmortem respectivamente, y de 5.01 utilizando el ensayo serológico ELISA. Así como los reportados por Andrade *et al.*, (2004), que comunican de una prevalencia de 0.0 % en examen premortem y postmortem y de 8.66 % con la prueba de ELISA.

Los bajos resultados obtenidos con los métodos directos son debido a que en la mayoría de los casos, algunas infecciones leves llegan a pasar desapercibidas, generalmente cuando hay menos de 10 cisticercos (Santi, 1997), o por que pueden haber cisticercos localizados en otros órganos (OPS/OMS, 1994), por lo

que no es recomendado en ninguno de los casos la utilización de estos tipos de exámenes directos cuando se trata de diagnosticar la cisticercosis porcina.

La técnica de electroforesis SDS-PAGE y elusión pasiva, permitió la semipurificación de la fracción de 53 KDa, ya que la concentración valorada a partir de la elusión de esta fracción, fue óptima para su utilización en la técnica de ELISA, por lo que puede competir con otros métodos de obtención de fracciones proteicas de alto y bajo peso molecular como la cromatografía de afinidad, la cromatografía en columna o el isoelectroenfoque, teniendo como ventaja su bajo costo con respecto a las anteriores, y su facilidad de acceso, 2000).

El alto porcentaje de sueros positivos (24,32%) obtenidos mediante la prueba de ELISA con la fracción de 53 kDa, sugiere que este es un polipéptido que es fácilmente reconocido por los anticuerpos presentes en suero, debido a que dicha fracción es un buen estimulante antigénico y siendo esta de fácil acceso al sistema inmunológico del huésped (Giraldo *et al.*, 2000 ;Vargas, 2004).

En estudios realizados por Dhanalashmi *et al.* (2005) sobre el perfil proteico de larvas de *Taenia solium*, se observó la presencia de una banda de 53 KDa en una electroforesis SDS-PAGE con las proteínas del extracto total de cisticercos (membranas, escolex y líquido vesicular), además no se evidenció la presencia de dicha banda cuando se realizó la electroforesis con las proteínas presentes en el escolex y líquido vesicular. Esto sugirió que la fracción de 53 KDa se encuentra localizada en la membrana vesicular del parásito y por lo tanto, puede ser de fácil reconocimiento por parte del sistema inmune del huésped.

Otro aspecto relevante de la alta reactividad inmunogénica de esta fracción, posiblemente sea su naturaleza glicoproteica. Según Grolg *et al.*, (1985), más del 65% de los constituyentes de la membrana vesicular son glicoproteínas, las cuales contienen cadenas de N-acetilglucosaminas y alfa-D-galactosa, estos azúcares

juegan un papel importante en la antigenicidad de esta proteína. En trabajos realizados por Obregón *et al.* (2002), se demostró la importancia de la antigenicidad de estos oligosacáridos, ya que cuando se sometieron a deglicolización enzimática algunas de estas glicoproteínas redujeron su antigenicidad hasta en un 70%.

Aunque el ensayo inmunoenzimático ELISA presenta niveles de sensibilidad y especificidad bajos (González, 1993), así como reacciones cruzadas con otros helmintos (Tsang *et al.*, 1989), en nuestro caso utilizamos una fracción proteica (53 KDa) que ha demostrado tener niveles de sensibilidad y especificidad cercanos al 100 %, así como de la ausencia de reacciones cruzadas con otras entidades parasitarias al ser evaluada con muestras de suero porcinos positivos para cisticercosis (Giraldo *et al.*, 2000).

La prueba diagnóstica permitió tener una mayor seguridad debido a que existe una reducción en la presentación de reacciones cruzadas con otras entidades parasitarias, porque esta fracción se encuentra por fuera del rango de las fracciones proteicas pertenecientes al antígeno B (95 KDa – 105 KDa) y que según la OPS/OMS, (1994) se encuentra ampliamente distribuido en otros céstodos. Esto demuestra que esta fracción proteica es ideal para el diagnóstico de la cisticercosis porcina en campo, como lo ha sido el propósito de este estudio.

La seroprevalencia general para cisticercosis porcina en el municipio de Galeras, Sucre fue del 24.3 %, indicando una de las seroprevalencias más altas de cisticercosis porcina en Colombia. Este valor es cercano a lo reportado por Serrano *et al.* (1992), el cual fue de 25.64 %. Sin embargo este resultado fue superior a los obtenidos en otros estudios similares realizados por Marin *et al.* (2004) donde reporta una seroprevalencia del 12.6%, 10.5% (Patarroyo *et al.*, 2004), 8.66% (Andrade *et al.*, 2003), 5.01% (Giraldo, 2005) y 4.65% (Agúdelo y Palacio, 2003). Mostrando la diversidad de seroprevalencias que existen en las

diferentes regiones del país como consecuencia de diversos factores como ubicación geográfica, costumbres y hábitos alimenticios, acceso a vías de comunicación, el efecto de la letrización y características propias del manejo de los animales.

La prevalencia encontrada en este estudio está más aproximada a la realidad, que las encontradas en mataderos registrados como legales debido a que en este tipo de mataderos no existe ninguna inspección sanitaria de la carne por parte de las autoridades locales.

El resultado de una prevalencia tan alta como la encontrada en el municipio de Galeras, probablemente se deba a que en esta región existan personas teniasicas que estén contaminando el medio ambiente con huevos de *Taenia solium*, en esta zona no existen datos a cerca de la prevalencia real de la teniasis humana y es posible que ésta infección sea endémica en este municipio, además se pudo observar que el sistema de crianza de cerdos es totalmente artesanal, la gran mayoría de estos animales deambulan libremente por las calles facilitándoles el acceso a las heces humanas como se pudo evidenciar durante la fase de campo, y no se realiza inspección sanitaria de la carne de cerdo. En adición, estos resultados llevan a deducir que el ciclo parasitario de la *Taenia solium* se estaría cerrando en esta región, lo que permite la presencia, transmisión y mantenimiento de la enfermedad entre los huéspedes intermediarios y definitivos.

Los resultados obtenidos muestran que hay una mayor proporción de animales infectados hembras. Aunque hasta el momento no se haya reportado que exista susceptibilidad a la cisticercosis por el sexo de los animales, siendo las diferencias observadas según el sexo, debidas al azar. El hecho de encontrar una mayor proporción de animales hembras infectadas se debe a que generalmente los animales machos son beneficiados y comercializados más rápidamente, mientras que las hembras permanecen en poder de las familias debido a que son utilizadas

como animales de reemplazo o de reproducción permitiéndoles un mayor tiempo de exposición. Los resultados de regresión logística muestran que no existe diferencia estadísticamente significativa entre la variable raza y la seropositividad. Sin embargo, se encontró una mayor proporción de cerdos de raza criolla infectados, probablemente este resultado sea debido al azar porque la proporción de animales criollos muestreados fue muy superior a la yelsi, además es más fácil para los pobladores de esta región adquirir un lechón de raza criolla que uno de raza yelsi por su bajo costo, esto hace suponer que predomine la raza criolla sobre la yelsi. De igual manera se encontró que la procedencia del animal no constituye un factor de riesgo para la presentación de cisticercosis, aunque la proporción de animales seropositivos de traspatio fue mayor a los que provenían de zonas rurales.

El análisis de regresión logística encontró que la variable edad no representa un factor de riesgo cuando se analizan los diferentes grupos etáreos. Sin embargo, se encontró que a mayor edad de los animales hay mayor probabilidad de infectarse. Este hallazgo resultaría lógico considerando que el medio ambiente se encuentra contaminado con huevos de *Taenia solium* y los animales que tienen la oportunidad de vivir más tiempo, también tienen más tiempo de exposición.

No obstante, el grupo etáreo que mayor proporción de animales seropositivos tuvo, fue el de 4 a 7 meses, siendo el grupo con la frecuencia más alta. Una posible explicación de estos resultados sería la persistencia de anticuerpos maternos transferidos a los lechones a través del calostro, los cuales permanecen en circulación hasta 8 meses, estos anticuerpos maternos pueden interferir en los resultados de estudios de seroprevalencia debido a que la prueba que se utiliza para el serodiagnóstico, no discrimina entre estos anticuerpos y los formados por una infección natural (Ccama, 2001).

7. CONCLUSIONES

- ☞ La técnica de ELISA utilizando la fracción de 53 KDa es útil para el serodiagnóstico de la cisticercosis porcina, como para investigaciones epidemiológicas de prevalencias que estén orientadas a establecer un control de la parasitosis en los porcinos.
- ☞ Se encontró que de los 188 porcinos muestreados, 47 resultaron positivos a la prueba serológica de ELISA, lo que representa una seroprevalencia de 24.3 para el municipio de Galeras, Sucre, y uno de los niveles más altos de reactividad serológica contra antígenos de *Taenia solium* en el país.
- ☞ El método de electroforesis SDS-PAGE y elusión pasiva permitió la purificación de la fracción de 53 KDa en una concentración óptima, siendo igual de efectivo a otros métodos de separación y a un menor costo.
- ☞ Los análisis de Ji-cuadrado indican que la característica ser macho representa un factor protector para la cisticercosis porcina.
- ☞ El análisis de regresión logística confirma que la característica ser macho representa un factor protector para la cisticercosis porcina.
- ☞ Los individuos del género femenino y el grupo etéreo comprendido entre 4 y 7 meses presentaron las frecuencias más altas de reactividad serológica frente a la fracción de 53 KDa.
- ☞ El método de inspección física es poco eficaz para el diagnóstico de la cisticercosis porcina en campo.

8. RECOMENDACIONES

- ☞ Establecer por medio de las entidades gubernamentales, la construcción de un matadero municipal que permita el sacrificio de los porcinos de la región bajo una adecuada inspección veterinaria.
- ☞ Establecer programas de vigilancia y control por parte de las entidades de salud pública del municipio que permitan educar a la comunidad dedicada a la explotación porcina y a los consumidores, y así evitar la propagación de esta parasitosis.
- ☞ Según los resultados obtenidos y a las características socioeconómicas de la región, sería recomendable evaluar la población humana y proveer algún tipo de asistencia para controlar el parásito en la región.
- ☞ Los métodos de inspección física para el diagnóstico de la cisticercosis porcina en campo, deben ir acompañados de métodos serológicos como el ELISA que permitan determinar el verdadero grado de infección en los porcinos sacrificados y destinados para el consumo humano.
- ☞ Se recomienda la prueba de inmunoensayo ELISA con la fracción de 53 KDa como prueba diagnóstica para la cisticercosis porcina por ser efectiva para determinar la presencia de anticuerpos anticisticercos y por ser de bajo costo.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acuña E, Caldera O, 2006. Seroprevalencia contra las fracciones polipeptídicas de 53 y 92 kDa del metacestodo de *Taenia solium* en habitantes del corregimiento de Sabanas de Pedro, Sucre. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad de Sucre. Facultad de educación y ciencias. Programa de Biología

Agudelo P, Palacio L, 2003. Prevalencia de anticuerpos para *Taenia solium* en humanos y cerdos en una zona endémica Colombiana REV NEUROL ; 36 (8) : 706-709.

Andrade R, Giraldo J. y Medina G, 2003. Estudio de la prevalencia de cisticercosis porcina en el matadero municipal de Tunja, Boyacá. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. Vol. 16 , N° 2 p.p 1-145.

Atias A, 1991. Parasitología Clínica. Tercera edición. Publicaciones técnicas mediterráneas. Santiago de Chile, Chile. P.355-359.

Botero D, Restrepo M, 2003. Parasitosis Humanas. Cuarta Edición. Corporación Para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia. P. 143.

Bradford M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. Anal Biochem; 72:248-54.

Burga J, 1999. Prevalencia de cisticercosis cerebral en porcinos comercializados en los mercados La Merced y Manuel Noriega de Cajamarca. Abril 1998 – marzo 1999. EN:

www.appaperu.org/appa%2520reunion/PDF/Ampliacion/Parte2/SadAniml/prevalenciadecysticercosiscerebral.PDF

Ccama A, 2001. Persistencia de anticuerpos maternos contra cisticercosis porcina y su efecto sobre el EITB. Tesis para optar el grado académico de magíster en Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. p.p. 1 - 53.

Cochran W, Cox G, 1976. Elementos de muestreo. Editorial el Manual Moderno S.A.

Cordero del Campillo, M. y Rojo, F. 1999. Parasitología veterinaria. Primera Edición. Mc Graw-Hill-Interamericana. España. P.493-495.

De Aluja A, Villalobos A, 2000. Cisticercosis por *Taenia solium* en cerdos de México. Vet. Méx., 31 (3).

Dhanalakshmi H, Jagannath M, D'souza P, 2005. Protein profile and serodiagnosis of *Taenia solium* bladder worm infections in pigs. Vet. arhiv 75, 505 - 512.

Euzéby J, 2001. Los parásitos de las carnes. Editorial Acribia S. A. Zaragoza, España. P. 134 – 152.

Falcón N, 1995. Uso del oxfendazole en el tratamiento de la cisticercosis porcina. Tesis Bachillerato. Fac. de Med. Vet. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. Lima. 51 p.
EN: Viterbo A, 2002. Seroprevalencia de cisticercosis porcina en las villas de Nueva Esperanza, Matapuquio y Turpo en la provincia de Andahuaylas – Departamento de Apurímac. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Flisser A, Gauci C, Zoli A, Lightowlers W, 2004. Induction of Protection against Porcine Cysticercosis by Vaccination with Recombinant Oncosphere Antigens. INFECTION AND IMMUNITY, P. 5292–5297 Vol. 72, No. 9.

Flisser A, Vargas-Parada L y Laclette P, 2006. *Taenia solium* .un parásito cosmopolita. INVESTIGACIÓN Y CIENCIAS. P. 24 – 33.

García H, González A, Gilman R, Palacios L, Jiménez I, Rodríguez S, Verastegui M, Wilkins P, Tsang V, and THE CISTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERÚ. 2001. Short report: transient antibody response in *Taenia solium* infection in field conditions - a major contributor to high seroprevalence. *Am J Trop Med Hyg* 65: 31–32.

García H, Gilman R, González A, Tovar M, and THE CISTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERÚ, 2003. Hyperendemic human and porcine *Taenia solium* infection in Peru. *Am J Trop Med Hyg*; 68: 268–75.

Giraldo J, Piragauta M, Castañeda H, Burgos J, 2000. Valoración de la inmunodominancia de tres fracciones proteicas (64, 53 y 32 kDa) obtenidas a partir de un extracto crudo del metacéstodo de *Taenia solium* con sueros porcinos. Revista Científica de UNINCCA. Vol. 6, No 1; P 19 – 34.

Giraldo J. Piragauta M, Galindo M, Castañeda H, 2001. valoración inmunológica, con sueros porcinos, de los polipéptidos 61-41-29 koa del metacéstodo de *Taenia solium*. Revista científica UNINCCA. Vol 7, N° 1 P 23-33.

Giraldo L, 2005. seroprevalencia de cisticercosis en cerdos de la central de beneficio de carnes "FRIGOCAFE" del municipio de Armenia, departamento del Quindío mediante la prueba inmunoensayo ELISA con la fracción de 12 KDa. Tesis para optar el título de Biólogo. Universidad del Quindío p.1-46.

Gonzalez A, Lopez-Urbina T, Tsang B, Tsang V, and THE CISTICERCOSIS WORKIN IN PERÚ, 2005a. Short report: Secondary Transission in Porcine Cysticercosis: Description and Their Potential Implications for Control Sustainability. Am. J. Trop. Med. Hig. 73, p.p. 501-503.

Gonzalez A, Gauci Ch, Barber D, Gilman R, Tsang V, Garcia H, Verástegui M, and Lightowlers M, 2005b. Short report: Vaccination of pigs to control Human Neurocysticercosis. Am. J. Trop. Med. Hig. 72 (6), p.p. 837-839.

Gonzales A, Cama V, Gilma R,1990. prevalence and comparison of serologic assay necropsy and tongue examination for the diagnocis of porcine cysticercosis in Perú. Am. J. Trop. Med. Hyg. 43:194-199.

Gonzáles A, 1993. evaluación del diagnóstico de la cisticercosis porcina por los métodos de Electroinmunotransferencia (EITB), ELISA y examen de lengua. Tesis Grado. Escuela de post-grado. Universidad Nacional Mayor de San Marco. Lima, Perú. P. 1-64.

Gonzáles A, Garidia C, Falcon N, Bernal T, Verastegui M, García H, Gilma R, Tsang V, and THE CISTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU, 2001. protection of pigs with cysticercosis from further infections after treatment with oxfendazole. Am. J. Trop. Med.Hyg. 65: 15-18.

Gonzáles A, Lopez – Urbina T, Tsang B, Gavidia C, Gacia H, Silva M, Gilman H, Tsang V, 2006. Transmisión dynamics of *Taenia solium* and potential for Pig-to-Pig transmission. Parasitology International; 55: s131- s135.

Grogl M, Estrada J, Macdonald G, Kuhn R, 1985. Antigen-Antibody analices in Neurocysticercosis. Journal parasitology.71:433-442.

Hancock K, Khan A, Williams F, Yushak M, Pattabnis S, Noh J, and Tsang V, 2003. Characterization of the 8-kilodalton Antigens of *Taenia solium* Metacestodes and Evaluation of their Use in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis. Journal of Clinical Microbiology. Vol.41. P. 2577-2586.

Huerta M, De Aluja A, Fragoso G, Toledo A, Villalobos N, Larralde C, Sciutto E, 2002. Synthetic peptide Vaccine against *Taenia soluim* pig Cysticercosis:

Successful Vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine*; 20: 262 – 266.

Ito A, Planearte A, Ma L, kong Y, flisser A, Schantz P, 1998. novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59:291-294.

Jimenez B, 1976. la cisticercosis por *C. celluocae* y como zoonosis. *Boletín de la Oficina Sanitaria panamericana.* 80, 403-410; Benitez, 1995. El sistema tradicional de producción porcina. FAO. Pág. 160. EN: Dorny P, Rodríguez – Hidalgo R. Benítez-Ortiz W, 2004. Taeniosis-cysticercosis in man and pigs in Ecuador. *Veterinary Parasitology.* 125: 183-202.

Londoño D, Álvarez J, Trujillo J, Jaramillo M, Restrepo B, 2002. The inflammatory cell infiltrates in porcine cysticercosis: immunohistochemical analysis during various stages of infection. *Veterinary Parasitology*; 109: 249-259.

Marín L, Ramírez D, Giraldo J, Yanine H, Loango N, Patarroyo F, 2004. Estudio de la seroprevalencia de la cisticercosis porcina en el matadero municipal de Calarcá, Quindío. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas.* Vol. 16 N° 2 p.1-145.

Medina G, 2004. Validación de 4 fracciones proteicas 53, 55, 60, 61 kDa obtenidas a partir de un extracto crudo del metacéstodo *T. solium* por la técnica de ELISA utilizando sueros humanos. Trabajo de grado. Universidad INCCA de Colombia. Facultad de Ciencias Naturales.

Murrell KD, 1991. Economic losses resulting from food-borne parasitic zoonoses. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.* 22: 377-381. EN: El libro de González

Ngowi H, Kassuku A, Maeda G, Boa M, Carabin H, Willingham III, 2004. Ricks factor for the Prevalence of Porcine Cysticercosis in Mbulu District, Tanzania. *Veterinary Parasitology.* 120:275-283.

Obregón A, Gil D, Gomez D, Sanzon F, Teale J, Restrepo, 2001. The role of N-linked carbohydrates in the antigenicity of *Taenia solium* metacestode glycoproteins of 12, 16 and 18 KD. *Molecular and Biochemical Parasitology*; 114: 209-215.

Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de Salud. 1994. Epidemiología y control de la teniasis/cisticercosis en América Latina. Versión 3.0. REF:PNSP/91- 28.

Organizacion Mundial de la Salud, 2002. Livestock: intensification and its risks, pp.58-63. EN: Eddi C, De Balogh k, Battaglia D, 2004. Veterinary public health activities at FAO: *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis. Veterinary Parasitology. 125: 183 – 202.

Organizacion Mundial de la Salud, 2003. Control de la neurocisticercosis. Boletin de la organizacion Mundial de la Salud.

Palomares F, Palencia g, Pérez R, Gonzalez-Esquivel D, Castro N, Jung Cook H, 2004. In vitro Effects of Albendazole Sulfoxide and Praziquantel against *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. American Society for Microbiology. 48: 2302-2304.

Patarroyo F, Carranza J, Giraldo J, Yanine H, 2004. Estudio de la seroprevalencia de la cisticercosis porcina en la planta de beneficio de ganado "CARLIMA" municipiode Ibague, Tolima. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. Vol. 16. N^a. 2. p.p. 1-145.

Ping-Chin F, Weng-Cheng Ch, Jian-Xun G, Yun-Xiang M, Zhi-Jie X, 2001. Experimental studies on physiological and morphological aspects of *Cysticercus cellulosae* in pigs. J. Microbiol. Immunol. Infects. Vol. 34: 252-258.

Pinilla G, Navarrete j, Almonacid C, Bermúdez M, Villamil L, 2003. Detección de antígenos dominantes para el diagnostico de cisticercosis por inmunoelctrotransferencia (EITB). NOVA / PUBLICACIÓN CIENTÍFICA. Vol. 1 p.p 704-2370.

Pinto P, Almeida L, Germano P, Vaz A, Nakamura P, 2002. Cisticercosis ocurrence and sannitary risks in groups of inspected and non-inspected swine in Brazil. Parasitologia Latinoamericana.57: 129-133.

Quintero C, Ruiz L, Moreno N, 2000. Prevalencia de cisticercosis porcina en los municipios de Moñitos y Los Córdoba. Córdoba, Colombia. Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 5 (2), 22.

Rojas G, Tato P, Solano S, Herrera L, Gutiérrez M, Salazar P, 1999. Estudio de la respuesta inmune humoral en cerdos infectados con huevos y posoncosferas de *Taenia solium*. Boletín Chileno de Parasitología. Vol. 54. N^o.3-4.

Sakai H, Barbosa H, Moraes E, Ueno H, 2001. Short report: Seroprevalence of *Taenia solium* cisticercosis in pigs in Bahia State, northeastern Brazil. Am. J. Trop. Med. Hig. 64: 268-269.

Sakai H, Sone M, Castro D, Nonaka n, Quan D, Canales M, Ljungstrom I, Sanchez A, 1998. Seroprevalence of *Taenia solium* cysticercosis in pigs in a rural community of Honduras. Veterinary Parasitology; 78: 233 –238

Sato M, Yamasaki H, Sako Y, Nacao M, Nakaya K, Plancarte A, Kassuku A, Dorny P, Geerts S, Ito A, 2003. Evaluation of tongue inspection and serology for diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in swine: usefulness of ELISA using purified glycoproteins and recombinant antigen. *Veterinary Parasitology*; 111: 309–322.

Sarti E, 1997. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. *salud pública de México*/ Vol.39, no.3, mayo-junio.

Serrano J, Prada F, Nicholls R, Duque S, Prada S, Lopez M,1992. Determinación de la prevalencia de cisticercosis porcina en cuatro veredas del municipio de Coyaima, Tolima.

Sloan L, Schneider S, y Rosenblatt J,1995. Evaluation of Enzyme-Linked immuno assay for Serological Diagnosis of Cysticercosis. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol.33. 3124-3128.

Tsang V, Brand J, Boyer A, 1989. An Enzyme-linked immunoelectrotransfer Blot Assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *Journal of Infection Diseases*. 159:50-59.

Vargas C, 2004. Valoración de la relatividad antigénica de las fracciones 118 a 66 kDa del metacéstodo *T. solium* con sueros humanos empleando la técnica de ELISA. Trabajo de grado. Universidad INCCA de Colombia. Facultad de Ciencias Naturales.

Vázquez S, Ballesteros G, Flisser A, Schantz P, 2001. Higiene and restraint of Pigs is associated with absence of *Taenia solium* cysticercosis in a rural community of Mexico. *Salud Pública de México*. Vol. 43: 574-576.

ANEXOS

ANEXO A. FORMULA PARA DETERMINAR EL TAMAÑO DE MUESTRA REPRESENTATIVA EN ESTUDIOS DESCRIPTIVOS.

$$n_o = \frac{Z^2 PQ}{E^2}$$

Donde:

n_o : tamaño de la muestra que debemos tomar

p : prevalencia esperada (50 %)

q : (1 - p) porcentaje esperado de habitantes sanos

z : nivel de confianza

E : grado de precisión

Esta fórmula está calculada para poblaciones infinitas. Para poblaciones pequeñas se debe aplicar una fórmula de corrección.

$$n = \frac{n_o}{1 + \frac{n_o}{N}}$$

Donde:

n : tamaño de la muestra corregida

n_o : tamaño de la muestra obtenida con la fórmula anterior

N : tamaño de la población

ANEXO B. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se desea realizar una investigación para conocer el grado de infección con cisticercosis que padecen los cerdos que se destinan para consumo humano en este municipio. Esta investigación no presentará ningún riesgo para usted ya que solo se trabajará con muestras sanguíneas de los cerdos que usted sacrifica.

Se garantiza que usted recibirá respuesta y aclaración a cualquier pregunta sobre los procedimientos, riesgos y asuntos relacionados con esta investigación. De igual manera se garantiza su libertad para retirar su aprobación en cualquier momento y dejar de participar sin que ello genere ningún perjuicio hacia usted,

Habiendo comprendido lo anterior Yo _____
declaro que me encuentro satisfactoriamente informado(a) a cerca de la investigación y por tanto autorizo la toma de muestras sanguíneas de los cerdos sacrificados en mi residencia.

A los _____ días del mes de _____ del año 2005.

ANEXO C. ENCUESTA PARA CISTICERCOSIS PORCINA
UNIVERSIDAD DE SUCRE

ENCUESTA PARA CISTICERCOSIS PORCINA

FECHA: _____ CODIGO: _____

SEXO DEL ANIMAL:

RAZA:

PROCEDENCIA:

EDAD:

PESO:

EVALUACIÓN PREMORTEM:

POSITIVO ----- NEGATIVO -----

Observaciones: _____

EVALUACIÓN POSTMORTEM:

POSITIVO ----- NEGATIVO -----

Observaciones: _____

ANEXO D. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ANTIGÉNICO TOTAL DE *Taenia solium*

Los quistes disectados de la carne de porcino fueron lavados y conservados en buffer PBS pH 7,4 con ampicilina 500mg/l. Estos quistes se maceraron en un homogenizador mecánico en baño de hielo hasta obtener la total disgregación de los quistes. Posteriormente el homogenizado se sometió a cuatro choques de ultrasonido a 20kHz por 30 segundos con intervalos de 15segundos; este homogenizado se mantuvo en agitación suave constante a cuatro grados centígrados por 48 horas y luego se centrifugó a 25.000g por una hora a cuatro grados centígrados. El sobrenadante se recolectó y se almacenó a -20°C y se tomó como antígeno total crudo y se descartó el precipitado.

**ANEXO E. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS DE
POLICRILAMIDA-BISACRILAMIDA (SDS-PAGE).**

1. SOLUCIÓN DE ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA (30% ACRILAMIDA - 0,8% BISACRILAMIDA)

Acrilamida	15,0g
Bisacrilamida	0,4g

Completar hasta 50 ml con agua tridestilada deionizada. Almacenar a 4°C, protegido de la luz.

2. SOLUCIÓN BUFFER DE RESOLUCIÓN (3,0 M TRIS-HCL, pH 8,8)

Tris-base	18,165g
-----------	---------

Completar con agua tridestilada deionizada hasta 50 ml. Ajustar pH 8,8 con HCl. Almacenar a 4°C protegido de la luz.

3. SOLUCIÓN BUFFER DE GEL CONCENTRADOR (0,5 M TRIS-HCL pH 6,8)

Tris-base	1.5137g
-----------	---------

Completar con agua tridestilada deionizada hasta 25 ml. Ajustar pH 6,8 con HCl. Almacenar a 4°C protegido de la luz.

4. SOLUCIÓN SDS 10%

Sodio Dodecil Sulfato	1g
-----------------------	----

Completar con agua tridestilada deionizada hasta 10 ml. Almacenar a 4°C, protegido de la luz.

5. SOLUCIÓN DEL INICIADOR DE POLIMERIZACIÓN (10% PERSULFATO DE AMONIO)

Persulfato de Amonio 0,1g

Completar con agua tridestilada deionizada hasta 1 ml. Almacenar a 4°C protegido de la luz.

6. SOLUCIÓN BUFFER LAVADO (0,375 M TRIS-CL, pH 8,8, 10 % SDS)

Tris - HCl pH 6,8 5 ml
SDS 10% 0,2 g

Completar volumen a 20 ml con agua tridestilada deionizada. Almacenar a 4° protegido de la luz.

7. SOLUCIÓN BUFFER TRATAMIENTO DE LA MUESTRA (Tris-HCl 60 mM, Glicerol 25% SDS 2 %, 2-mercaptoetanol 14.4 mM, Azul de bromofenol 0,1%)

Tris-HCl pH 6, 8 40 µl
Glicerol 0,5ml
SDS 0,2ml
2-mercaptoetanol 50 µl
Azul de bromofenol 1% 100 µl
Agua tridestilada deionizada. 90 µl

Completar volumen a 1 ml. Almacenar a 4°C protegido de la Luz.

8. SOLUCIÓN BUFFER DE ELECTROFORESIS (0,025 M TRIS-CL pH 8,3; 0,192 M GLICINA; 0,1% SDS)

Tris-base 1.5125 g
Glicina 7.2 g
SDS 10 % 5ml

Completar a 500 ml con agua tridestilada deionizada. Almacenar a temperatura ambiente.

9. SOLUCIÓN COLOREADORA (0,025% AZUL DE COOMASSIE R-250; 40% ALCOHOL METÍLICO; 7% ÁCIDO ACÉTICO)

Azul de Coomassie 0,25g
Alcohol metílico (agitar hasta disolver) 400ml
70 ml ácido acético

Completar hasta 1 L con agua tridestilada deionizada. Almacenar a temperatura ambiente, protegido de la luz.

10 SOLUCIÓN DECOLORADORA I (40% ALCOHOL METÍLICO; 7% DE ÁCIDO ACÉTICO).

Alcohol metílico 400ml
Ácido acético 70ml

Completar hasta 1L con agua tridestilada deionizada. Almacenar a temperatura ambiente protegido de la luz.

11. SOLUCIÓN DECOLORADORA II (5% ALCOHOL METÍLICO; 7% ÁCIDO ACÉTICO)

Alcohol metílico 50ml
Ácido acético 70ml

Completar a 1L con agua tridestilada deionizada. Almacenar a temperatura ambiente.

12. PREPARACION DE GEL DE POLIACRILAMIDA AL 10%

	GEL SEPARADOR	GEL CONCENTRADOR
	10%	5%
ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA	1.666 ml	250 µl
TRIS-HCL 1.5M pH 8.8	0.625 ml	
TRIS HCL 0.5M pH 6.8		500 µl
SDS 10%	50µl	20 µl
PERSULFATO DE AMONIO	20 µl	15 µl
AGUA DESTILADA	2.65ml	1.21ml
TEMED	5 µl	5 µl
Volumen Final	5 ml	2 ml

ANEXO F. SOLUCIÓN BUFFER DE ELUCIÓN (TRIS-HCL 0,25 M; EDTA 0,25 M; PH 9.0)

Tris-HCl	0.3027g
EDTA	0.9306g

Ajustar pH 9.0 con hidróxido de sodio concentrado. Completar a 10ml con agua tridestilada deionizada. Almacenar a 4°C.

ANEXO G. SOLUCIÓN COLOREADORA (0,025% AZUL DE COOMASSIE R-250; 40% ALCOHOL METÍLICO; 7% ÁCIDO ACÉTICO)

Azul de Coomassie	0,25g
Alcohol metílico (agitar hasta disolver)	400ml
70 ml ácido acético	

Completar hasta 1 L con agua tridestilada deionizada. Almacenar a temperatura ambiente, protegido de la luz.

SOLUCIÓN DECOLORADORA I (40% ALCOHOL METÍLICO; 7% DE ÁCIDO ACÉTICO).

Alcohol metílico	400ml
Ácido acético	70ml

Completar hasta 1L con agua tridestilada deionizada. Almacenar a temperatura ambiente protegido de la luz.

SOLUCIÓN DECOLORADORA II (5% ALCOHOL METÍLICO; 7% ÁCIDO ACÉTICO)

Alcohol metílico	50ml
Ácido acético	70ml

Completar a 1L con agua tridestilada deionizada. Almacenar a temperatura ambiente.

ANEXO H. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA TÉCNICA DE BRADFORD.

1. SOLUCIÓN BRADFORD

Azul de Coomassie G – 250	0.01%
Metanol absoluto 95%	50 ml
Acido Ortofosfórico 85 %	100 ml

Disolver 100 mg de azul de Coomassie G – 250 en 50 ml de etanol y 100 de acido ortofosforico 85% (v/v). Completar el volumen a 1 Litro. Filtrar 2 veces y guardar en botella ambar a 4 °C.

ANEXO I. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELISA

1. BUFFER COATING (CARBONATO-BICARBONATO) PH 9.6 - 0.2M

Na ₂ CO ₃	1.3.g
NaHCO ₃	3.09g

Aforar a 500 ml con agua destilada y ajustar pH y guardar en nevera.

2. BUFFER FOSFATO SALINO(PBS) PH 7.4 0.05M

Na ₂ HPO ₄	16.7g
NaH ₂ PO ₄	5.7g
NaCl	85g
NaN ₃	100mg
Agua destilada	10lt

Ajustar pH a 7.4 y guardar en nevera.

3. BUFFER DE LAVADO- PBS-T20 0.05%

Tween 20	50 µl
Buffer Fosfato Salino	100ml

4. BUFFER DE BLOQUEO

a. Albúmina 1%

Albúmina serica bovina	1g
PBS-T20 0.05%	100ml

5. SUSTRATO P- NITROPHENYL PHOSPHATO (OPD)

Adicionar una tableta de PNP a 5ml de buffer diethanolamida y disolver por 10 minutos. El sustrato es estable a 4°C por una hora.

6. SOLUCIÓN STOP- NAOH 2.5 M

NaOH	120g	
Agua destilada		1l

Guardar a temperatura ambiente y en frasco oscuro.

ANEXO J. FORMULAS PARA DETERMINAR LA PREVALENCIA.

1. CÁLCULO DE PREVALENCIA POR EXAMEN PREMORTEM.

$$P E \text{ pre} = \frac{nP}{nT} \times 100$$

nP : Positivos según la prueba.

nT : Total población muestreada

2. CÁLCULO DE PREVALENCIA POR EXAMEN POSTMORTEM.

$$P E \text{ post} = \frac{nP}{nT} \times 100$$

nP : Positivos según la prueba.

nT : Total población muestreada.

3. CÁLCULO DE LA SEROPREVALENCIA EN EL ESTUDIO SEGÚN LA PRUEBA.

$$P = \frac{nP}{nT} \times 100$$

nP : Positivos según la prueba.

nT : Total población ensayada

4. PREVALENCIA CORREGIDA.

$$\bar{P} = \frac{P + \beta - 1}{A + \beta - 1}$$

P : Prevalencia encontrada.

A : Sensibilidad de la prueba.

β : Especificidad de la prueba.