

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA|
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA “ALBERTO
CAZORLA TALLERI”



INCREMENTO DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN EN LA TÉCNICA
DE WESTERN BLOT PARA MEJORAR EL DIAGNÓSTICO DE
CISTICERCOSIS

Jorge Pablo Flores Alomía

Tesis para optar el Título de Licenciado en Biología

LIMA – PERÚ

2016

PhD. Hugo García Lescano
ASESOR

JURADO CALIFICADOR

Dra. Patricia Sheen Cortavarria
PRESIDENTE

Mag. Luz Marina Pacheco Lechuga
VOCAL

Mag. Ana Colarossi Salinas
SECRETARIA

DEDICATORIA

Dedico la presente Tesis a mis asesores, Silvia Rodríguez y Hugo García; por brindarme el apoyo y la orientación haciendo posible el desarrollo de este proyecto y a mi madre, Rosa Alomía; por el amor y fuerza incondicional que siempre me ha demostrado.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Rosa Alomía, por motivarme durante toda esta etapa académica, siendo un modelo de disciplina y constancia.

Ph.D. Hugo García y Magister Silvia Rodríguez, asesores de Tesis y amigos, los cuales me abrieron las puertas de su laboratorio, me brindaron su tiempo, condujeron y aconsejaron en el desarrollo de este trabajo incondicionalmente.

Ph.D. Luz Carbajal Arroyo, por su paciencia y amabilidad asesorándome en el análisis estadístico, interpretación de resultados, y entendimiento de las herramientas estadísticas aplicadas.

A Karen Arteaga, Erika Pérez y a la MSc. Yessenia Castillo por sus enseñanzas y apoyo en los procedimientos y técnicas inmunológicas empleadas a lo largo de este proyecto.

CONTENIDO

CARÁTULA

ASESOR

JURADO CALIFICADOR

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN.....	15
II. MARCO TEÓRICO.....	17
2.1 Generalidades, epidemiología y ciclo de vida del parásito.....	17
2.2 Diagnóstico de la neurocisticercosis en el Perú.....	22
2.3 Tratamiento y control de la cisticercosis/teniasis.....	24
2.4 Antecedentes.....	25
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN.....	31
3.1 Hipótesis.....	31
3.2 Objetivos.....	31
3.2.1 Objetivo principal.....	31
3.2.2 Objetivos secundarios.....	32

IV. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	33
4.1 Procedimiento experimental.....	33
4.1.1 Preparación de los reactivos.....	33
4.1.1.1 Reactivos para la formación de minigeles de gradiente.....	33
4.1.1.2 Reactivos para la electroforesis.....	34
4.1.1.3 Reactivos para la electrotransferencia.....	34
4.1.2 Elaboración de minigeles de gradiente.....	34
4.1.3 Electroforesis.....	35
4.1.4 Electrotransferencia.....	36
4.1.5 Control del slap de tiras de nitrocelulosa.....	36
4.1.6 Procedimiento para aplicar dos protocolos de Western blot en simultáneo.....	38
4.1.6.1 Protocolo <i>Estándar</i>	38
4.1.6.2 Protocolo <i>Over night</i>	39
4.2 Diseño del estudio y análisis estadístico.....	39
4.2.1 Diseño del estudio.....	39
4.2.2 Análisis estadístico.....	40
 V. RESULTADOS.....	 41
 VI. DICUSIONES.....	 47
 VII. CONCLUSIONES.....	 52

VIII. RECOMENDACIONES.....53

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....54

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. (A) Escólex de *Taenia solium* observados en un microscopio electrónico de barrido **C: Cuello, V: Ventosas, R: Rostelo.**⁴³ (B) Huevos de *Taenia solium*⁴⁴ (C) Estructuras internas de un proglótide maduro de *T. solium*.⁴⁵

Figura 2. Ciclo de vida de *T. solium*. La vida del parásito alterna entre el ser humano como huésped definitivo y el cerdo como principal huésped intermediario. **Estado adulto (1):** El parásito habita el intestino delgado del ser humano, infección conocida como teniasis. **Proglótides grávidos (2):** Segmentos con el útero bien desarrollado y decenas de miles de huevos. **Huevos (3):** Los huevos son expulsados junto con la materia fecal. **Cisticercosis porcina (4):** El cerdo se infecta al ingerir heces donde hay segmentos del parásito adulto y huevos con el potencial suficiente para convertirse en un cisticerco (forma larvaria del parásito). El ciclo de vida se completa al consumir carne de cerdo mal cocida infectada con cisticercos. **Neurocisticercosis (5):** La falta de educación e higiene o la convivencia con un portador del parásito adulto (familiar), pueden ocasionar la ingestión de huevos desarrollando una neuropatología.⁴⁶

Figura 3. Resultados de la EITB utilizando fluido de antígeno vesicular de *Taenia solium* (cisticerco). (A) Antígeno de fluido vesicular reducidos con DTT. (B) Antígenos purificados en CDC-USA. (C) Antígenos de fluido vesicular sin reducir. (D) Marcador de peso molecular. (a) Concentración de 0.0125 mg/ul. (b) Concentración de 0.0250 mg/ul. (c) Concentración de 0.05 mg/ul. Se detalla que la concentración óptima fue de 0.0250 mg/ul y el número final de bandas específicas consideradas fueron 8.⁶

Figura 4. Imágenes captadas desarrollando la técnica Western blot. **(A) (B)** Cámara electroforética con el “Antígeno de *Taenia solium*” (cisticerco) a una concentración de 0.017ug/ml a 80mA durante 40 minutos. **(C)** “Papeles filtro” y “Membranas de nitrocelulosa (NC)” en recipientes con “Buffer de Transferencia” para que se humedezcan y estén en condiciones correctas. **(D)** Disposición: 4 geles por “Sandwich” y dos “Sandwich” por cámara de transferencia. **(E)** Sistema de refrigeración acoplado al sistema de transferencia (2.0A por 2 horas).

Figura I. Resultados obtenidos por el protocolo *Estándar* de la muestra 155407 – 158209.

Figura II. Resultados obtenidos por el protocolo *Estándar* de la muestra 158211 – 160255.

Figura III. Resultados obtenidos por el protocolo *Estándar* de la muestra 160263 – 161961.

Figura IV. Resultados obtenidos por el protocolo *Estándar* de la muestra 161965 – 167725.

Figura V. **(A)** Resultados obtenidos por el protocolo *Estándar* de la muestra 167731 – 168604. **(B) (C)** Controles respectivos para el protocolo *Estándar*.

Figura VI. Resultados obtenidos por el protocolo *Over night* de la muestra 155407 – 158209.

Figura VII. Resultados obtenidos por el protocolo *Over night* de la muestra 158211 – 160255.

Figura VIII. (A) Resultados obtenidos por el protocolo *Over night* de la muestra 160263 – 160376. (B) Resultados obtenidos por el protocolo *Over night* de la muestra 160379 – 162716.

Figura IX. Resultados obtenidos por el protocolo *Over night* de la muestra 162735 – 168604.

Figura X. (A) (B) Controles respectivos para el protocolo *Over night* .

Figura XI. Controles respectivos para el protocolo *Over night* .

Figura XII. Repeticiones para las muestras procesadas bajo el protocolo *Estándar*.

Figura XIII. Repeticiones (27) realizadas bajo ambos protocolos *Estándar* y *Over night*.

Figura XIV. Controles del slap para las 27 muestras repetidas.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Estudio piloto realizado en Julio 2011 – INCN, protocolos *Estándar (WB1H)* y *Over night (WB12H)*. **(A)** Incremento de positividad para sueros con reacción a diferente número de banda. **(B)** Incremento de positividad global.

Tabla 1. Resultados obtenidos en los protocolos *Estándar (WB1H)* y *Over night (WB12H)*. “0” representa resultados negativos y “1” representa resultados positivos.

Tabla 2. **(A)** Frecuencias simples y en porcentajes de los resultados obtenidos al seguir los protocolos *Estándar (WB 1H)* y *Over night (WB12H)*. **(B)** Incremento de positividad global.

Tabla 3. Frecuencias simples y porcentajes acumulados considerando solamente los resultados positivos obtenidos al seguir los protocolos *Estándar (WB 1H)* y *Over night (WB 12H)*.

Tabla 4. Diferencia entre la cantidad de bandas que reacciona cada muestra desarrollando los protocolos *Over night (WB12H)* y *Estándar (WB1H)* en simultáneo.

Tabla 5. Test de McNemar: Protocolo *Over night (WB 12H)* frente al protocolo *Estándar (WB 1H)*.

Tabla 6. Test Z – Comparación de dos proporciones. Protocolo *Estándar (P₁)* y protocolo *Over night (P₂)*.

RESUMEN

La cisticercosis es una patología que afecta tanto al humano como al ganado porcino y se produce al ingerir huevos de la especie *Taenia solium*. La prevalencia en el Perú oscila entre el 10 y el 20% de la población en general y su epidemiología está estrechamente relacionada con factores salubres, socioeconómicos y socioculturales. La cisticercosis tiene un impacto en la salud importante debido a la presentación particular de la patología llamada Neurocisticercosis (NCC) considerada la parasitosis humana accidental más frecuente del sistema nervioso central (SNC). Esta neuropatología puede estar asociada desde un 30% hasta 50% a casos epilépticos y son consideradas como zonas claramente endémicas toda la sierra, costa norte y selva alta de nuestro Perú. Actualmente, la técnica de inmunodiagnóstico Western blot (EITB) viene siendo efectiva por su alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad posicionándose como la técnica más óptima para el diagnóstico serológico de la cisticercosis.

La presente investigación analiza y compara estadísticamente los resultados obtenidos entre dos protocolos de Western blot; el protocolo *Estándar* originalmente desarrollado por el investigador *Tsang y colaboradores* y el protocolo *Over night* utilizado actualmente en diferentes diagnósticos de rutina y centros de investigación donde los tiempos de incubación con el suero y conjugado están modificados. Los resultados sugieren un incremento en la positividad de muestras (7.96%) a favor del protocolo *Over night* especialmente en sueros con reacciones a 3 bandas (4.55%). Estos resultados obtenidos concuerdan con el proyecto piloto. Tanto el Test de McNemar como el Test Z para comparación de proporciones fueron significativos con un $p < 0.05$. En conjunto, las evidencias sugieren el incremento en los tiempos de incubación para obtener resultados más certeros y confiables en el inmudiagnóstico de cisticercosis.

ABSTRACT

Cysticercosis is a disease that affects both human and pig and occurs by ingesting eggs of *Taenia solium* species. The prevalence in Peru is between 10 and 20% of the general population and its epidemiology is closely related to salubrious, socioeconomic and sociocultural factors. Cysticercosis has an important impact on health due to the particular presentation of the pathogenesis called Neurocysticercosis (NCC) considered the most frequent parasitosis accidental human central nervous system (CNS). This neuropathology may be associated with epilepsy from 30% to 50% of the cases and are considered clearly endemic areas all the highlands, north coast and upper jungle of Peru. Currently, the immunodiagnostic Western blot technique (EITB) is being effective because of its high sensitivity, specificity and reproducibility positioning itself as the most optimal technique for serological diagnosis of cysticercosis.

This research analyzes and compares the results obtained statistically between two protocols Western blot; *Standard* protocol originally developed by researcher *Tsang et al* and *Over night* protocol currently used in different routine diagnostics and research centers where incubation times with serum and conjugate are modified. There was an increase of 7.96% in the positive results over the WB 12H (*Over night*) protocol especially in sera with a 3 bands reactions (4.55%). These results are consistent with the pilot project. Both the McNemar test and the Z Test for comparison of proportions were significant at $p < 0.05$. Overall, the evidence suggests increased incubation times for more accurate and reliable results in the immudiagnosis of cysticercosis.

I. INTRODUCCIÓN

El cestodo de la especie *Taenia solium* es un parásito cosmopolita que representa un gran problema tanto en la salud y como en la económica del mundo especialmente en países en vías de desarrollo como el nuestro. La patología que compromete al presente parásito se denomina Cisticercosis y afecta tanto al humano como al ganado porcino. Los factores identificados y que favorecen el cierre del ciclo de infección están íntimamente relacionados con la ignorancia y la falta de higiene.^{18, 19, 25}

Estudios realizados por “The Cysticercosis Working Group in Perú” entre otros, revelan que la prevalencia de cisticercosis en el Perú oscila entre el 10 y el 20% de la población en general, lo cual es alarmante debido a la presentación crítica y particular de esta patología llamada Neurocisticercosis (NCC) que encabeza el tipo de infección más común causado por un parásito al Sistema Nervioso Central (SNC). Esta neuropatología puede causar desde epilepsia hasta meningitis pasando por fuertes cefaleas pudiendo acabar con la vida productiva de una persona y causarle la muerte. En distintos centros de salud del Perú, la técnica inmunodiagnóstica actual para cisticercosis se denomina Western blot (EITB) y se ha demostrado que es altamente específica (100%), sensible (98%), fácil de aprender, reproducible y más económicas y accesibles que la TC y RM.^{5, 20}

A inicios de estas dos últimas décadas, diferentes investigaciones y diagnósticos de rutina en el Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN - Laboratorio de Cisticercosis en Lima), liderados por el Dr. Hugo García y la Magister Silvia Rodríguez encontraron que la positividad de las muestras utilizando la técnica Western blot era mayor al incrementar los tiempos de incubación con la muestra y el conjugado. Fue en Julio del 2011 cuando realizamos un estudio piloto en el INCN para determinar los parámetros y la magnitud en la que mejora la técnica identificando un incremento en la positividad de las muestras de 15.39% con un aumento considerable en los sueros con reacciones a 1(6.51%) y 3(5.92%) bandas.

A pesar que en la actualidad la sutil modificación es utilizada en diferentes diagnósticos de rutina y centros de investigación del Perú, aun no se han reportado investigaciones consistentes, con un tamaño muestral óptimo y herramientas estadísticas suficientes que sustenten y fortalezcan la aplicación de esta metodología.

Es en este sentido que la presente tesis compara dos protocolos de Western blot utilizados para el diagnóstico de cisticercosis: protocolo *Estándar* donde los tiempos de incubación tanto para la muestra como para el conjugado son de 1 hora (*Tsang et al., 1989*) y protocolo *Over night* donde los tiempos de incubación para la muestra y conjugado están modificados siendo de toda la noche y dos horas respectivamente; permitiendo mediante un análisis estadístico relacionar el tiempo de incubación, las bandas presentes y el incremento en la positividad de muestras, sugiriendo el uso de esta metodología para un diagnóstico más confiable y robusto.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades, epidemiología y ciclo de vida del parásito

El estadio larvario del cestodo *Taenia Solium* es el agente causal de la cisticercosis, una patología que afecta tanto al humano como al ganado porcino.¹⁰ Una presentación particularmente importante en esta patogenia es la NCC debido al fuerte impacto en la salud, difícil diagnóstico clínico (los signos y síntomas que presenta la enfermedad son comunes en otros desórdenes neurológicos), compleja interacción y coordinación interdisciplinaria para el control y tratamiento de la teniasis/cisticercosis y la relevante repercusión en la economía del Perú.^{6, 14, 23} Su sintomatología tiene un espectro muy amplio, usualmente asociado a cuadros convulsivos si se presenta en la forma intraparenquimal o asociado a hipertensión endocraneana si es extraparenquimal.¹³

Desde 1987 “The Cysticercosis Working Group in Perú” entre otros, han desarrollado estudios epidemiológicos utilizando principalmente la técnica del Western blot y exámenes imagenológicos logrando obtener información muy interesante. Dentro de sus resultados mencionan que la prevalencia de la cisticercosis en la poblacional peruana en general oscila entre 10-20%²⁴ y que aquella se incrementa hasta un 26.9% en zonas endémicas como la Costa norte (Tumbes), toda la sierra y la selva alta del Perú.²⁸ Así mismo, se registra que la incidencia o prevalencia de epilepsia en el Perú llega a ser tres veces mayor en Tumbes que sus correspondientes valores de USA y Europa,¹⁴ inclusive exámenes serológicos o de imagen realizados en personas con epilepsia en zonas endémicas, sugieren que cerca del 30% a 50% se deben a la presencia de cisticercos en el SNC.¹⁴ Toda esta información ha servido para evidenciar el papel de la NCC en la etiología de la epilepsia y para poder ejecutar diferentes intervenciones de control, tratamiento y programas de eliminación de esta patología.

La prevalencia de cisticercosis en el cerdo como blanco vulnerable y eslabón importante en la transmisión del parásito también ha sido investigada por diferentes autores, reportando resultados con altos valores en zonas endémicas que van desde un 20% hasta un 72 o 75%. En contra parte la prevalencia de teniasis en zonas endémicas se encuentra desplazada con cifras que van desde 0.6 a 7%,²⁸ otros autores mencionan entre 0.5 y 1%.¹⁴ Teniendo en cuenta el terrible perjuicio al hombre, el costoso manejo hospitalario de un paciente con NCC (de aproximadamente 1100 dólares) y la pérdida económica en cerdos, se considera una suma de decenas de millones de dólares gastados al año lo cual logra ser un foco importante de atención en un país en vías de desarrollo como el nuestro.^{23, 24, 25, 32}

Los factores determinantes que favorecen la presencia, transmisión y permanencia de esta patología están íntimamente relacionados con la ignorancia y la falta de higiene, así como el difícil acceso a centros de salud e instituciones educativas, mercados estratos socioeconómicos donde las poblaciones marginadas continúan practicando las tradicionales crianzas de cerdos acompañadas de malos hábitos, condiciones y comercialización ilegal.^{18, 19, 25, 28}

Taenia solium es una especie de cestodo de la familia *Taeniidae* caracterizado por poseer un escólex o cabeza como órgano de fijación seguido de un adelgazamiento llamado cuello, porción germinal donde nacen los proglótides o segmentos que componen el cuerpo del parásito. Las 4 ventosas y el rostelo permiten la adherencia a la mucosa del intestino delgado. El conjunto de proglótides conforman el estróbilo del parásito que puede llegar a medir normalmente entre 1.5 a 5 metros de largo, los más cercanos al cuello son los más indiferenciados y conforme se van distanciando van madurando progresivamente hasta proglótides grávidos que son segmentos con el útero bien desarrollado y decenas de miles de huevos.^{20, 33}

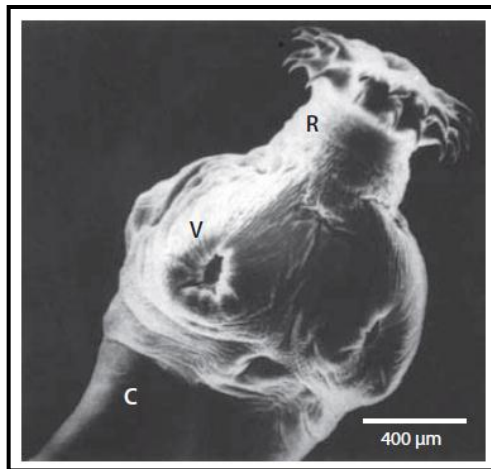
La patología intestinal de este parásito se denomina Teniasis y se adquiere al ingerir carne de cerdo mal cocida contaminada con el estadio larvario denominado Cisticerco. Al entrar en el organismo la activación del parásito es favorecida por los jugos gástricos, intestinales y sales biliares estableciéndose en el intestino delgado donde lleva a cabo su desarrollo hasta el estadio adulto consumiendo los nutrientes necesarios para su supervivencia. El parásito va expulsando huevos esporádicamente junto con la materia fecal.

Cabe resaltar que el parásito hermafrodita tiene un particular ciclo de vida donde el hombre es el único hospedero definitivo.^{10, 11} Los cerdos solo actúan como hospederos intermediarios ingiriendo estos huevos por su fácil acceso a letrinas y cercanía a las heces fecales distribuyéndolos a través de sus vasos sanguíneos a gran diversidad de tejidos, principalmente a músculos estriados originando el quiste denominado Cisticerco y la patología llamada Cisticercosis porcina.^{12, 27}

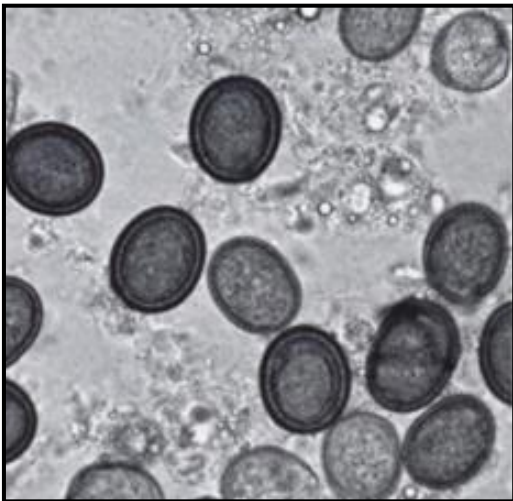
El hombre en algunos casos puede ser hospedero intermediario accidental.¹⁵ Esta patología es producida al ingerir huevos de *T. solium* y el mecanismo de esta infección fecal - oral es el resultado del contacto con personas parasitadas y que mantienen malos hábitos higiénicos.¹⁶ Se ha descrito también *autoinfección interna*, producido por personas que estando infectadas con el estadio adulto del parásito producen antiperitismo intestinal.³³

Una vez ingeridos los huevos estas alcanzan las enzimas proteolíticas y sales biliares generando la liberación de los embriones hexacantos que se adhieren a la mucosa penetrando en la pared intestinal, alcanzando los vasos sanguíneos y distribuyéndose a diversos órganos desarrollando cisticercosis humana.³³ Su establecimiento en el hospedero puede variar ampliamente, desde tejidos de diferentes sistemas corporales que suelen ser benignos y asintomáticos hasta localizaciones oculares y de SNC generalmente malignas, el nombre de esta última patología es llamada Neurocisticercosis (NCC).¹⁷

A



B



C

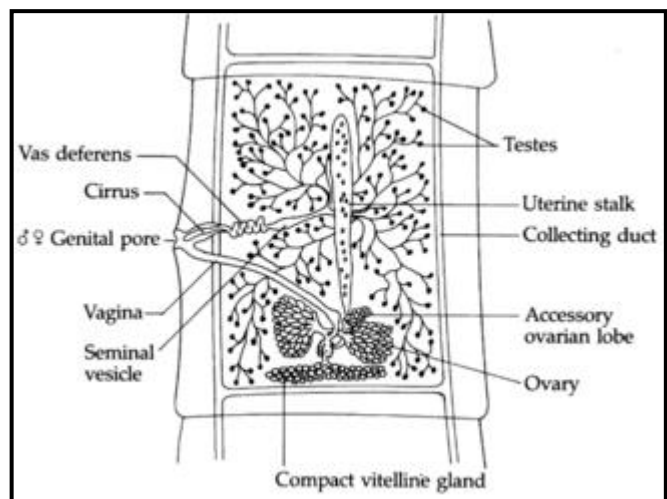


Figura 1. (A) Escólex de *Taenia solium* observados en un microscopio electrónico de barrido **C: Cuello, V: Ventosas, R: Rostelo.**⁴³ **(B)** Huevos de *Taenia solium*⁴⁴ **(C)** Estructuras internas de un proglótide maduro de *T. solium*.⁴⁵

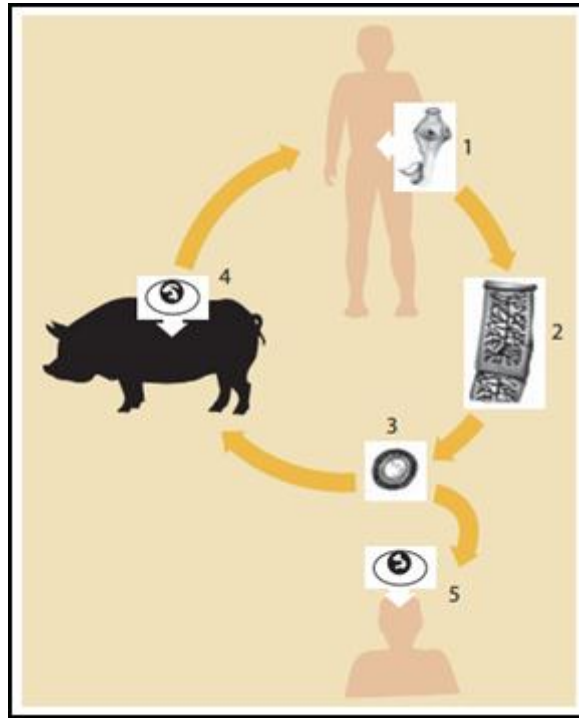


Figura 2. Ciclo de vida de *T. solium*. La vida del parásito alterna entre el ser humano como huésped definitivo y el cerdo como principal huésped intermediario. **Estado adulto (1):** El parásito habita el intestino delgado del ser humano, infección conocida como teniasis. **Proglótides grávidos (2):** Segmentos con el útero bien desarrollado y decenas de miles de huevos. **Huevos (3):** Los huevos son expulsados junto con la materia fecal. **Cisticercosis porcina (4):** El cerdo se infecta al ingerir heces donde hay segmentos del parásito adulto y huevos con el potencial suficiente para convertirse en un cisticerco (forma larvaria del parásito). El ciclo de vida se completa al consumir carne de cerdo mal cocida infectada con cisticercos. **Neurocisticercosis (5):** La falta de educación e higiene o la convivencia con un portador del parásito adulto (familiar), pueden ocasionar la ingestión de huevos desarrollando una neuropatología.⁴⁶

2.2 Diagnóstico de la neurocisticercosis en el Perú

El diagnóstico de la NCC aun en la actualidad es complejo. Se realizan diagnósticos radiológicos (estándar de oro),²⁰ basados mayormente en tomografía computarizada (TC) y Resonancia Magnética (RM). La TC es útil porque permite identificar la etapa en la que se encuentra el parásito (Vesicular, Coloidal y Granular). También cumple un rol importante en el seguimiento postquirúrgico de complicaciones ocasionadas por cisticercosis. La RM es el estudio más sensible para el diagnóstico de las formas vesiculares y coloidales, puede detectar ciertas lesiones y realizar diagnósticos diferenciados.²⁰ Con estos dos métodos se logró determinar la localización, el número y estadio evolutivo del parásito.

Los diagnósticos de laboratorio como exámenes coproparasitológicos, biometría hemática y examen citoquímico de LCR no son patognomónicos para NCC. La radiografía simple del cráneo, la neumoencefalografía, la ventriculografía, la angiografía y la mielografía son muy invasivos o de baja sensibilidad y especificidad^{19, 20}

La aplicación de ensayos inmunodiagnósticos para cisticercosis mostró ser una alternativa muy interesante para apoyar el diagnóstico clínico.³⁴ Desde 1948 se han descrito diferentes técnicas inmunológicas como la reacción de fijación de complemento³⁷ para medir anticuerpos en el LCR, la Inmunoelectroforesis (IEF), la Hemaglutinación Pasiva³⁸, la Inmunofluorescencia indirecta³⁹ y la Doble Inmunodifusión, pero resultaron ser técnicas de relativa complejidad y baja sensibilidad.^{20, 34} Con los diferentes avances tecnológicos e investigaciones sucesivas se logró que en la actualidad se tenga pruebas altamente específicas, sensibles, reproducibles y de fácil manejo,¹⁹ ofreciendo gran utilidad en zonas donde la TC y la RM son de difícil acceso, se tiene pocos recursos y es imprescindible la necesidad de estudios epidemiológicos.^{8, 20}

Actualmente las técnicas Enzyme linked immuno-Sorbent Assay (ELISA) y Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot Assay (EITB) mejor conocida como Western blot son las de mayor uso.^{1, 20, 34} Diferentes investigaciones señalan que Western blot es; entre las técnica inmunodiagnósticas, la Gold Standar para cisticercosis, de mayor sensibilidad y especificidad, reproducible y de fácil manejo ^{2, 3, 8} superando el problema de la actividad cruzada del ELISA (en suero) ^{4, 34} y resultando ser un gran avance en el diagnóstico de esta patología.

Cabe mencionar que estudios asociados han desarrollado ensayos simples y rápidos, que puedan funcionar en el campo sin la necesidad de condiciones complejas de un laboratorio. Entre estas se puede resaltar al ELISA de tira reactiva para detección de coproantígenos usada en estudios epidemiológicos (México, sensibilidad 88% y especificidad 100%) ³⁴, Dot blot (sensibilidad del 100% y especificidad del 87,7%) y aglutinación de látex (sensibilidad del 93,3% y especificidad del 89,2%).³⁵

Es importante recalcar ciertas características de las pruebas inmunodiagnósticas como el Western blot: Estas pruebas detectan la presencia del anticuerpo circulando en el suero del paciente, no pueden diferenciar entre anticuerpos maternos (endémicos) de los formados por infección natural y ciertas bandas como la 24, 23 y 13 kDa pueden reaccionar con el estadio adulto del parásito (teniasis). Teniendo esto en cuenta, se puede deducir que es incorrecto utilizar esta técnica para el seguimiento y postratamiento de cisticercosis tanto para humanos como para cerdos y que además no se va poder discriminar entre un paciente con NCC o cisticercosis muscular.^{8, 27}

2.3 Tratamiento y control de la cisticercosis/teniasis

Desde el año 2000, diversos estudios relacionados a la cisticercosis desarrollados en gran parte por “The Cysticercosis Working Group in Perú” y el Laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva de la Facultad de Medicina Veterinaria (UNMS)^{23, 27} entre otros, revelan que la cisticercosis porcina constituye un serio problema de salud pública en el país, alcanzando prevalencias desde un 5% en Monte Redondo, Piura hasta un 88% en la ciudad de Maceda, San Martín.²⁷

Las investigaciones epidemiológicas implicadas han resultado tener una gran importancia en la actualidad, principalmente por ser el cerdo una pieza clave en la transmisión del parásito y por servir como blanco vulnerable para el control y tratamiento de esta patología.^{25, 26} La técnica del Western blot también ha sido muy útil en estas investigaciones y la información obtenida confirma que la prevalencia de cisticercosis porcina es un buen indicador para predecir una infección por *Taenia solium*, y por lo tanto una posible presencia de NCC.²⁷ Estas evidencias permitieron que se desarrollen estrategias de control y tratamiento para la teniasis/cisticercosis en el Perú.

El tratamiento contra la teniasis utiliza dosis orales únicas Niclosamida (2g en adultos y 1g en niños) o Praziquantel (5 a 10mg por kg). El tratamiento de NCC utiliza Albendazol (15 mg/k/d por una a dos semanas) o Praziquantel (50 mg/kg/d por dos semanas) como antiparasitario acompañado de un tratamiento para las manifestaciones clínicas¹⁴. Investigaciones realizadas para el control y tratamiento de cisticercosis desde inicios de 1980 incluyeron el tratamiento masivo de la población humana con Praziquantel o Niclosamida acompañados de esfuerzos constantes en mejorar la educación sanitaria pero los resultados no son alentadores.^{14, 29, 30}

Dentro de las últimas investigaciones se propuso en 1996 tratar a la población porcina con Oxfendazole (30mg/kg) e inmunizarla con una vacuna TSOL18 proporcionada por la universidad de Melbourne en Australia logrando buenos resultados.^{14, 31}

2.4 Antecedentes

La técnica de Western blot originalmente emplea una fracción enriquecida de glicoproteínas que se obtiene al purificar el extracto crudo de cisticercos por cromatografía de afinidad en una columna de lentil-lectina. Las glicoproteínas (GPs) se separan por la técnica electroforesis en acrilamida y posteriormente se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, la cual es cortada en tiras de aproximadamente 3 milímetros de ancho. Cada tira se incuba con una muestra de suero o LCR y por un ensayo inmunoenzimático se revelan de 1 a 7 bandas específicas para cisticercosis humana, considerando como positivo cuando reaccionaba como mínimo a 1 de ellas (GP50, GP 42-39, GP 24, GP 21, GP 18, GP 14, GP 13).^{2, 5, 34}

La sensibilidad y especificidad obtenidas fueron del 98 y 100% respectivamente, su eficacia fue determinada usando 148 sueros de pacientes con cisticercosis confirmada, 56 pacientes sanos y 18 diferentes tipos de enfermedades heterólogas. No hubo diferencia significativa entre suero y LCR y no se encontraron reacciones cruzadas. Los resultados fueron muy alentadores mostrando una alta estabilidad de los reactivos.⁵

Más adelante, diferentes investigaciones surgieron con la finalidad de conocer los alcances de la técnica. Se estudió los resultados con muestras de suero y saliva donde se encontró que el suero (100%) era de lejos mucho más sensible que la saliva (70.4%).²

Se empezaron a realizar investigaciones entre pacientes multiquísticos, unikuísticos, calcificados tanto con suero como con LCR patológicamente confirmados (por TC y RM) donde los resultados mostraron una sensibilidad del 94% en pacientes multikuísticos y 28% en pacientes unikuísticos, se encontró también que la probabilidad de obtener un resultado positivo para un paciente con quiste calcificado era menor frente a un paciente con quiste viable, además que los antígenos eran detectados con mayor frecuencia en el suero que en el LCR.⁹

En 1992 Hermes Escalante, basándose en que el fluido vesicular del cisticercos contiene antígenos más sensibles y específicos que los demás componentes del parásito^{40, 41} y que además la técnica de EITB permite estudiar con anticipación cada uno de los componentes antigénicos⁴², logró estandarizar la técnica en el Perú utilizando “antígenos del fluido vesicular” (*Taenia Solium*); una variante de la técnica originalmente realizada por *Tsang et al., 1989*. Estos antígenos eran obtenidos de cerdos naturales infectados bajo condiciones de reducción con ditiotreitól y usados a la concentración de 0.025 ug/ul/mm, los componentes antigénicos eran separados en un gel de poliacrilamida y luego transferidos a un papel de nitrocelulosa encontrando en este caso una sensibilidad del 91% y especificidad del 100% utilizando sueros de pacientes parasitológicamente confirmados. Los resultados obtenidos fueron muy alentadores debido a la coyuntura en la que nos encontramos, logrando ser una técnica eficiente, factible, menos laboriosa, de bajo costo, útil para el diagnóstico serológico y útil para estudios epidemiológicos. La técnica considera 8 bandas específicas para cisticercosis (35, 31, 24, 23, 18, 17, 14 y 13 kDa), (**ver Figura 3**).⁶

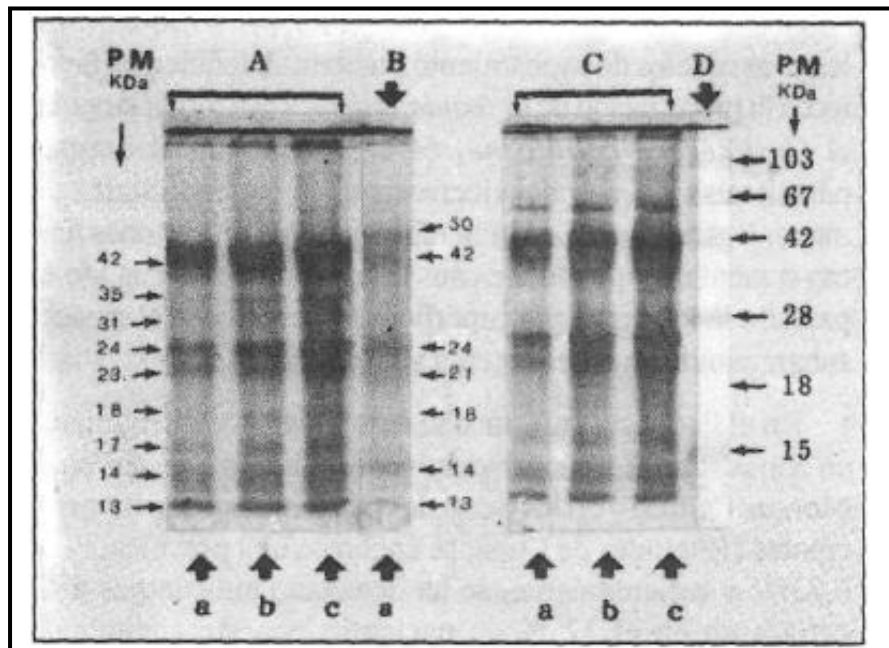


Figura 3. Resultados de la EITB utilizando fluido de antígeno vesicular de *Taenia solium* (cisticerco). **(A)** Antígeno de fluido vesicular reducidos con DTT. **(B)** Antígenos purificados en CDC-USA. **(C)** Antígenos de fluido vesicular sin reducir. **(D)** Marcador de peso molecular. **(a)** Concentración de 0.0125 mg/ul. **(b)** Concentración de 0.0250 mg/ul. **(c)** Concentración de 0.05 mg/ul. Se detalla que la concentración óptima fue de 0.0250 mg/ul y el número final de bandas específicas consideradas fueron 8.⁶

Diferentes investigaciones han permitido evaluar la técnica de Western blot utilizando como antígeno fluido vesicular; entre ellos, se puede citar a los estudios realizados en el Hospital Regional Docente de Trujillo ³⁶ y el Hospital Belén de Trujillo donde más allá de los alcances epidemiológicos, se pueden encontrar una sensibilidad del 87% para todos los casos con NCC, 90% para quistes viables, 92% con quistes múltiples, 71% con quistes calcificados y 60% con quistes únicos,⁷ sugiriendo nuevamente que la sensibilidad disminuye para estos dos últimos escenarios. Todos con exámenes radiológico y parasitológicamente confirmados.

Considerando este conjunto de evidencias la técnica de Western blot se estableció como una interesante alternativa para el diagnóstico de NCC en el Perú, teniendo precaución en pacientes con quistes únicos y calcificados.^{8, 20} No obstante, la optimización del Western blot para el diagnóstico de esta patología en todas sus manifestaciones clínicas continuó siendo uno de los temas de bastante interés hasta la actualidad. A inicios de estas últimas décadas, diferentes investigaciones y diagnósticos de rutina en el Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN - Laboratorio de Cisticercosis en Lima), encabezados por el Dr. Hugo García y la Magister Silvia Rodríguez encontraron que la positividad de las muestras utilizando la técnica de Western blot (empleando una fracción enriquecida de glicoproteínas por *Tsang et al., 1989*) era mayor al incrementar los tiempos de incubación con la muestra y el conjugado, sutil modificación que actualmente se sigue utilizando en diferentes diagnósticos de rutina y centros de investigación del Perú. Sin embargo, a la fecha no se han reportado investigaciones consistentes, con un tamaño muestral óptimo y herramientas estadísticas suficientes que sustenten y fortalezcan la aplicación de esta metodología.

Con la finalidad de obtener resultados coherentes y confirmar la posible tendencia, realizamos un estudio piloto en el INCN, Julio 2011; a 169 pacientes que acudían diariamente al diagnóstico de NCC, los resultados revelaron que al incubar la muestra con el antígeno por toda la noche e incubar con el conjugado dos horas, la positividad de las muestras se incrementaba un 15.39% con un aumento considerable en los sueros con reacciones a 1(6.51%) y 3(5.92%) bandas (las muestras no fueron confirmadas por TC o RM), (**ver Tabla I**).

Por lo explicado anteriormente el presente estudio reproduce la técnica de Western blot para el diagnóstico de cisticercosis aplicando la modificación en los tiempos de incubación para la muestra (toda la noche) y conjugado (dos horas) permitiendo a través de un análisis estadístico evaluar el incremento en la positividad de las muestras, respaldando y sustentando así el uso de esta metodología para un diagnóstico más confiable y robusto.

Tabla I. Estudio piloto realizado en Julio 2011 – INCN, protocolos *Estándar (WB1H)* y *Over night (WB12H)*. **(A)** Incremento de positividad para sueros con reacción a diferente número de banda. **(B)** Incremento de positividad global.

(A)

Número de banda	Protocolo WB 1H		Protocolo WB 12H		Diferencia	
	Frecuencias	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
0	84	49.70	58	34.32	26	15.38
1	7	4.14	18	10.65	11	6.51
2	11	6.51	15	8.88	4	2.37
3	8	4.73	18	10.65	10	5.92
4-6	21	12.43	22	13.02	1	0.59
7	38	22.49	38	22.49	0	0.00
TOTAL	169	100.00	169	100.00		

(B)

	Protocolo WB 1H		Protocolo WB 12H		Diferencia	
	Frecuencias	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Muestras negativas	84	49.704	58	34.320		
Muestras positivas	85	50.296	111	65.680	26	15.385
TOTAL	169	100.000	169	100.000		

III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS DE INVESTIGACION

3.1 Hipótesis

El aumento del tiempo de incubación de la muestra y conjugado en la técnica de Western blot para el diagnóstico de cisticercosis, incrementará aproximadamente en un 15% la positividad de muestras.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo principal

Evaluar el incremento en la positividad de muestras por la técnica de Western blot para el diagnóstico de cisticercosis aumentando los tiempos de incubación de la muestra y conjugado.

3.2.2 Objetivos secundarios

- Evaluar el incremento en la positividad de muestras para sueros con reacciones de 1 banda.
- Evaluar el incremento en la positividad de muestras para sueros con reacciones de 2 bandas.
- Evaluar el incremento en la positividad de muestras para sueros con reacciones de 3 bandas.
- Evaluar el incremento en la positividad de muestras para sueros con reacciones de 4-6 bandas.
- Evaluar el incremento en la positividad de muestras para sueros con reacciones de 7 bandas.
- Determinar si a mayor tiempo de incubación habrá mayor incremento del número de bandas.

IV. MATERIALES Y METODOLOGIA

4.1 Procedimiento experimental

4.1.1 Preparación de reactivos

4.1.1.1 Reactivos para la formación de minigeles de gradiente

“*Resolving gel Buffer*” (411.2g de TRIS en 1600ml de agua destilada, se utilizó una membrana de 0.2um para filtrar, se niveló el pH con HCl hasta 9.18 y el volumen final fue de 2000ml). “*Resolving gel Acrilamida*” (400 g de acrilamida y 10 g de N, N'-Methylene bisacrilamide (BIS) en 650ml de agua hirviendo, una vez frio se llevó a 1000ml y se utilizó una membrana de 0.2um para filtrar). *Persulfato de Amonio (APS)* (30 mg de APS por cada 5 ml de agua, se utilizó un total de 120mg de APS). *Tetrametiletilendiamina (TEMED)* (Utilizar 300 ul de TEMED por cada 4 ml de agua, se utilizó un total de 1200ml de TEMED).

“*Stacking Buffer*” (13.1g de TRIS en 350ml de Agua destilada y se llevó el pH a 6.14 con H₂SO₄ 2M, se utilizó una membrana de 0.2um para filtrar y el volumen final fue de 500ml), “*Stacking Acrilamida*” (60 g de Acrilamida y 6 g de N, N'-Methylene bisacrilamide (BIS) en 300 ml de agua hirviendo, se utilizó una membrana de 0.2um para filtrar y el volumen final fue de 500ml).

Isobutanol saturado (Se mezcló dos volúmenes iguales de Isobutanol y agua Milli-Q, se utilizó un total de 60ml). “*Pushing Solution*” (Azul de Bromofenol al 1% en etanol y se tituló esta mezcla con una solución de TRIS en agua destilada hasta que se tornó de color azul intenso, se utilizó una membrana de 0.2um para filtrar. Se agregó Glicerol al 30% para ser percibido en el uso de cantidades pequeñas).

Todos los reactivos se prepararon con un día de anticipación (excepto el TEMED y APS que se prepararon inmediatamente) y se guardaron en un frasco ámbar a refrigeración.

4.1.1.2 Reactivos para la electroforesis

El “*Lower Buffer*” (la solución consta de “*Resolving gel buffer*” y Agua destilada en una proporción 1:3, volumen final fue de 4000ml), “*Upper Buffer*” (9.88 g de ácido Bórico, 19.68 g de TRIS y 4 g de SDS al 10%, se utilizó una membrana de 0.2um para filtrar, volumen final fue de 4000ml). Los reactivos se prepararon con un día de anticipación y se guardaron en un frasco ámbar a refrigeración El “*Antígeno de T. solium*” (*cisticerco*) utilizado tuvo una concentración de 0.017ug/ml.

4.1.1.3 Reactivos para la electrotransferencia

Se preparó el “*Buffer de Transferencia*” (500ml de “*Resolving Gel Buffer*” y 800 ml de Metanol en 2700 ml de agua destilada, el volumen final fue de 4000ml). El reactivo se preparó con un día de anticipación y se guardó en un frasco ámbar a refrigeración. Se alistó “*Papeles filtro 0.2um*” y “*Membranas de nitrocelulosa (NC)*” (7.5cm x 7.5cm).

4.1.2 Elaboración de minigeles de gradiente

Se prepararon los “Geles de gradiente” o “Geles de concentración heterogénea” siguiendo como referencia el protocolo *Standard Operating Procedure (SOP)*.²² Se utilizaron 2 concentraciones de 15% (35ml de *Resolving acrilamida*) y 25% (58.7ml de *Resolving acrilamida*).

Ambas concentraciones se mezclaron en una cámara formadora de geles compuesta por una bomba peristáltica y el sistema formador de gradiente con agitación constante hasta el final. El *Isobutanol* se añadió primero, luego se agregaron las dos concentraciones (15 y 25%) formando así una gradiente y finalmente la *Solución pushing* formando el soporte del gel. Todo el proceso duró entre 15 y 20 minutos y finalmente se dejó reposar toda la noche, tiempo necesario para la gelificación.

Luego del periodo de gelificación de los “Geles de gradiente”, estos fueron lavados con etanol al 90% y con agua destilada. Paralelamente se mezclaron los siguientes reactivos: “*Stacking Buffer*”, “*Stacking Acrilamida*”, *APS* (1:6) y *TEMED* (1:4) para formar el “Gel de concentración homogénea (gel de relleno)” utilizado para rellenar los espacios que han sido descubiertos alrededor del “Gel de gradiente”. Se utilizó 3ml de cada uno de los reactivos por cada 8 minigeles (144 tiras) que se deseaba preparar. Se dejó reposar entre 10 – 15 minutos hasta que gelifique.

4.1.3 Electroforesis

Se utilizó 75ul de SDS por cada gel (se agregó 1ul de SDS por cada 100ul de antígeno), un total de 2400ul. Posteriormente se colocó en baño maría 90°C por 5 minutos. Paralelamente se ensambló los soportes con los geles adentro verificando la hermeticidad del sistema. Se vertió la cantidad suficiente de “*Lower Buffer*” (*cámara exterior*) y “*Upper Buffer*” (*cámara interior*) conectando el Cátodo y Ánodo adecuadamente y se agregó el “*Antígeno de T. solium*” (*cisticerco*) a una concentración de 0.017ug/ml. Como primer paso, el sistema fue sometido a una corriente de 40mA (por cada 8 geles) para poder tener el antígeno distribuido uniformemente y en un mismo nivel sobre el gel. Después se sometió a 80mA durante 40 minutos para que el antígeno empiece a difundir dentro del “Gel de gradiente”.

4.1.4 Electrotransferencia

Se colocó inicialmente “*Papeles filtro*” y “*Membranas de nitrocelulosa (NC)*” en recipientes con suficiente “*Buffer de Transferencia*” por 30 minutos para que se humedezcan y estén en condiciones correctas. Se armaron las cámaras de transferencia las cuales estaban formadas por: 4 geles por “*Sandwich*” y 2 “*Sandwich*” por cámara. El “*Sándwich*” consta del siguiente orden: *Esponja, papel filtro 0.2um, NC, “Gel de gradiente”, papel filtro 0.2um, Esponja*.

Finalmente se colocó el sistema de refrigeración y se llenó la cámara con el “*Buffer de Transferencia*” hasta el tope. Se cerró el sistema y se conectó los electrodos adecuadamente a 2.0A por 2 horas, de esta forma las proteínas se desplazaron hacia el polo positivo y se quedaron retenidas en la membrana de *NC*.

4.1.5 Control del slap de tiras de nitrocelulosa

En esta etapa de la metodología solo nos quedamos con la *NC*, el resto se descartó siguiendo los métodos de bioseguridad y protocolos de laboratorio adecuados. Se lavó con PBS – Tween 0.3% por 20 minutos y después solo 3 veces con PBS por 5 minutos. Se cortó la *NC*, en tiras de 3mm y seguidamente se procedió a descartar 2 tiras de cada extremo. Se define como Slap al conjunto de tiras de nitrocelulosa (3mm) elaboradas en un momento determinado bajo condiciones determinadas.

El control para el slap elaborado tuvo el siguiente procedimiento: Se utilizó una tira del medio del slap para el control negativo y una tira de cada extremo para el control positivo débil (dilución de 1/256). Una vez obtenido los resultados adecuados, se identificó al slap con una marca distintiva, se colocó la fecha y se guardó a refrigeración por un día.

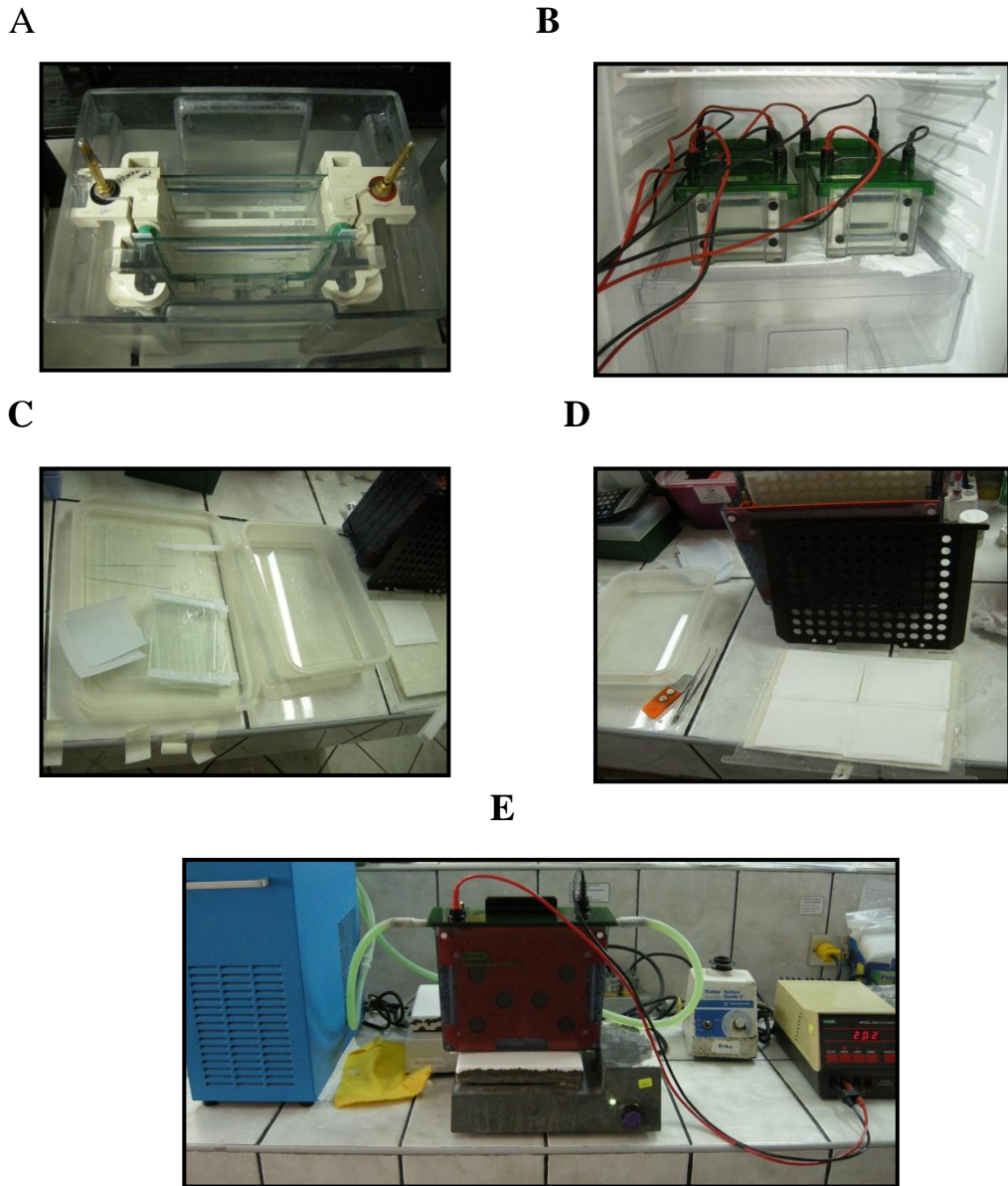


Figura 4. Imágenes captadas desarrollando la técnica Western blot. **(A) (B)** Cámara electroforética con el “Antígeno de *Taenia solium*” (cisticerco) a una concentración de 0.017ug/ml a 80mA durante 40 minutos. **(C)** “Papeles filtro” y “Membranas de nitrocelulosa (NC)” en recipientes con “Buffer de Transferencia” para que se humedezcan y estén en condiciones correctas. **(D)** Disposición: 4 geles por “Sandwich” y dos “Sandwich” por cámara de transferencia. **(E)** Sistema de refrigeración acoplado al sistema de transferencia (2.0A por 2 horas).

4.1.6 Procedimiento para aplicar dos protocolos de Western blot en simultáneo

Se evaluó la misma muestra siguiendo dos protocolos en simultáneo. Bajo las mismas condiciones y concentraciones pero con diferencia en los tiempos de incubación de la muestra y el conjugado. Se definió como *Estándar* al protocolo donde el tiempo de incubación tanto para la interacción antígeno-anticuerpo como para del conjugado fue de 1 hora. Por otro lado, se definió como *Over night* al protocolo modificado, donde los tiempo de incubación para el antígeno-anticuerpo y conjugado fueron por toda la noche y dos horas respectivamente.

Los resultados se analizaron mediante diferentes herramientas estadísticas descritas más adelante. Para evaluar el incremento en la positividad de muestras se comparó la cantidad de bandas presentes en cada tira para cada protocolo. Se espera que aplicando el protocolo *Over night* obtengamos un aumento en la positividad de las muestras y este pueda ser estadísticamente significativo.

4.1.6.1 Protocolo *Estándar*

Cada tira se colocó en su canaleta respectiva conteniendo *500 ul PBS-Tween 0.3% - 5% Leche con 14ul de la muestra*. Luego la muestra pasó a ser incubada por 1 hora a 4°C en agitación continua. Posteriormente se lavó 4 veces con *PBS-Tween 0.3% a 75°C* con intervalos de 5 minutos, se agregó el *conjugado de cabra anti-IgG humana en una dilución de 1:10000* y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente manteniendo una agitación continua.

Posteriormente se realizó un segundo lavado similar al primero pero con *PBS-Tween 20 al 0.3%* a temperatura ambiente por 3 veces y luego con *PBS* sólo 2 veces más. Se agregó la *solución de coloración* constituido por *10 ml de PBS con 2.5 ul de peróxido de hidrógeno al 30%* y *200ul de diaminobencidina (DAB)* a partir de una solución *stock de DAB en PBS 50 mg/ml*. Al finalizar la reacción, se pudo visualizar sobre las tiras de *NC* de 1 a 7 bandas específicas para cisticercosis humana.

4.1.6.2 Protocolo *Over night*

Se agregó de igual forma el *PBS-Tween-leche* junto con la muestra bajo las mismas proporciones pero con un tiempo de incubación *Over night* (toda la noche) a 4°C en agitación continua. De igual forma se lavó y se agregó el conjugado respectivo bajo las mismas proporciones pero dejándolo incubar por un tiempo de 2 horas a temperatura ambiente en agitación continua. Posteriormente se realizó un segundo lavado con *PBS-tween 20 0.3%* y luego un tercero con *PBS* solo. Se agregó la solución de coloración constituido por *PBS, peróxido de hidrógeno y DAB* en las mismas proporciones y luego se pasó a analizar las bandas.

4.2 Diseño del estudio y análisis estadístico

4.2.1 Diseño del estudio

El presente estudio fue desarrollado en el laboratorio de Inmunología Parasitaria, LID, UPCH. Las muestras de pacientes, los controles negativos, positivos débiles y positivos fuertes que formaron parte del estudio, fueron proporcionados por el mismo laboratorio y se encontraban almacenadas a -20 ° C. El diseño del estudio es experimental descriptivo. El proyecto fue aprobado por el Comité Institucional de Ética (CIE) de la UPCH.

4.2.2 Análisis estadístico

Basándonos en el ensayo piloto previo (Julio 2011, INCN, donde se estructuró el estudio en 5 grupos: 1 banda, 2 banda, 3 banda, 4 – 6 bandas y 7 bandas y el incremento en la positividad de las muestras fue de 15.39%) se calculó el tamaño muestral utilizando un diseño pareado (0.06 de precisión y 95% de nivel de confianza). La inferencia estadística demostró que es óptimo un tamaño muestral de 264 debido a que es el mayor volumen de muestras necesarias para responder a todos los objetivos planteados (para 1 banda $n \approx 256$, 2 bandas $n \approx 200$, 3 bandas $n \approx 264$, 4 – 6 bandas $n \approx 73$, 7 bandas “no se encontró diferencias”).²¹

Para responder los objetivos y alcanzar las expectativas de esta investigación, se utilizó un análisis estadístico que comprende la elaboración de tablas descriptivas de doble entrada (comparación de frecuencias simples, acumuladas, porcentajes, proporciones, entre otros). Además se utilizó el Test de McNemar para evaluar variaciones de los resultados entre protocolos y el Test Z para comparar dos proporciones.

V. RESULTADOS

Las siguientes tablas presentan los resultados obtenidos procesando las 264 muestras por ambos protocolos *Over night* y *Estándar* simultáneamente. En el protocolo *Over night* las muestras fueron sometidas a una incubación con el antígeno por toda la noche a 4°C y a una incubación de 2 horas con el conjugado de cabra anti-IgG humana a temperatura ambiente. Por otro lado, en el protocolo *Estándar*, las muestras fueron sometidas a una incubación de 1 hora tanto en la interacción del antígeno - anticuerpo como con el conjugado de cabra anti-IgG humana. Cada uno de las tiras para ambos protocolos fueron fotografiadas e identificadas con el nombre del autor, protocolo y fecha de elaboración (**ver Anexo**).

La **Tabla 1** muestra de forma descriptiva los resultados para las 264 muestras analizadas. Se puede apreciar como el protocolo *Over night* alcanza un total de 168 muestras positivas mientras que el protocolo *Estándar* solo un total de 147. En detalle se logra ver como son discriminadas 24 muestras como positivas a favor del protocolo *Over night*. Por otro lado se observan 3 muestras que mostrando ser negativas para el protocolo *Over night* dieron como resultado positivo en el protocolo *Estándar*.

Tabla 1. Resultados obtenidos en los protocolos *Estándar (WB1H)* y *Over night (WB12H)*. “0” representa resultados negativos y “1” representa resultados positivos.

		Protocolo WB 12H		
		0	1	Total
Protocolo WB 1H	0	93	24	117
	1	3	144	147
Total		96	168	<u>264</u>

Continuando con el análisis se presenta la **Tabla 2A**, en ella se exponen los resultados obtenidos utilizando ambos protocolos precisando las frecuencias y porcentajes para las muestras negativas, con reacción a 1 banda, a 2 bandas, a 3 bandas, a 4-6 bandas y a 7 bandas. Adicionalmente nos muestra la diferencia entre los dos protocolos indicándonos el porcentaje de positividad obtenido.

En detalle uno puede apreciar una gran cantidad de frecuencias situadas a los extremos para ambos protocolos. En el protocolo *Estándar* observamos que del total de muestras analizadas 44.32% tienen un resultado negativo y 25.76% tienen un resultado positivo a las 7 bandas. De igual forma podemos apreciar que en el protocolo *Over night* los resultados negativos al ensayo representan un 36.36% y los positivas a las 7 bandas un 27.27%. También se puede ver que las muestras con resultado positivo a 4, 5 y 6 bandas fueron agrupadas (bandas 4 - 6) siguiendo la metodología y objetivos del estudio, representando en el protocolo *Estándar* y *Over night* un 12.12% y 12.88% respectivamente.

Los resultados revelan que el incremento de positividad en las muestras se obtuvo para todos los casos, siendo los sueros con reacciones a 3 bandas (4.55%) la más marcada. La **Tabla 2B** nos resume la diferencia global encontrada entre ambos protocolos indicándonos que el incremento de porcentaje de positividad de muestras es de 7.95%.

Tabla 2. (A) Frecuencias simples y en porcentajes de los resultados obtenidos al seguir los protocolos *Estándar (WB 1H)* y *Over night (WB12H)*. **(B)** Incremento de positividad global.

(A)

Número de banda	Protocolo WB 1H			Protocolo WB 12H			Diferencia	
	Frecuencia	%	%	Frecuencia	%	%	Frecuencia	%
Negativo	117	44.32	44.32	96	36.36	36.36	21	7.95
1	8	3.03	3.03	10	3.79	3.79	2	0.76
2	19	7.20	7.20	20	7.58	7.58	1	0.38
3	20	7.58	7.58	32	12.12	12.12	12	4.55
4	15	5.68	} 12.12	13	4.92	} 12.88	2	0.76
5	8	3.03		10	3.79			
6	9	3.41		11	4.17			
7	68	25.76	25.76	72	27.27	27.27	4	1.52
TOTAL	264	100.00	100.00	264	100.00	100.00		

(B)

	Protocolo WB 1H		Protocolo WB 12H		Diferencia	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Muestras Negativas	117	44.32	96	36.36		
Muestras Positivas	147	55.68	168	63.64	21	7.95
TOTAL	264	100.00	264	100.00		

La **Tabla 3** nos muestran en frecuencia y porcentaje los valores obtenidos para cada una de las bandas pero enfocandonos solo el grupo de resultados positivos. Como se puede observar los porcentajes fueron recalculados. En el protocolo *Estándar* podemos apreciar como los grupos de muestras que salieron positivas a las 7 bandas tiene una mayor predominancia alcanzando un 46.26%, seguidamente los resultados positivos para 3 y 2 bandas obtienen valores de 13.61% y 12.93% respectivamente. Así mismo el porcentaje acumulado nos indica que aproximadamente el 30% (31.97%) de las muestras positivas tienen reacción por lo menos a 3 bandas.

Con respecto al protocolo *Over night* aquellas muestras positivas a 7 y 3 bandas obtuvieron los porcentajes más altos siendo 42.86% y 19.05% respectivamente. Así mismo, el porcentaje acumulado nos indica que aproximadamente el 35% (36.90%) de las muestras positivas tienen reacción por lo menos a 3 bandas, un 5% más que lo obtenido por el protocolo *Estándar*.

Tabla 3. Frecuencias simples y porcentajes acumulados considerando solamente los resultados positivos obtenidos al seguir los protocolos *Estándar (WB 1H)* y *Over night (WB 12H)*

Banda	Protocolo WB 1H			Protocolo WB 12H		
	Frecuencia	%	% Acumulado	Frecuencia	%	% Acumulado
1	8	5.44	5.44	10	5.95	5.95
2	19	12.93	18.37	20	11.90	17.85
3	20	13.61	31.97	32	19.05	36.90
4-6	32	21.77	53.74	34	20.24	57.14
7	68	46.26	100.00	72	42.86	100.00
Total	147	100		168	100	

Para poder visualizar y comparar el número de bandas que reacciona cada paciente al procesar una misma muestra por ambos protocolos se elaboró la **Tabla 4**. En ella se ha trazado una línea diagonal que identifica las muestras que lograron evidenciar igual cantidad de bandas presentes, sobre la diagonal se encuentran las muestras que se volvieron positivas o incrementaron en cantidad de bandas a favor del protocolo *Over night*, del otro lado de la diagonal aplicando el mismo concepto se encuentran las variaciones a favor del protocolo *Estándar*.

Bajo esa premisa, se observa con mayor claridad que las 24 muestras discriminadas como positivas por el protocolo *Over night*, tienen reacciones no solo a 1 banda sino hasta 4 bandas presentes.

Adicionalmente, se evidencia un total de 38 muestras consideradas positivas por ambos protocolos pero que incrementaron en número de banda a favor del protocolo *Over night*, entre aquellos podemos mencionar: Muestras que reaccionaban con 1 banda bajo el protocolo *Estándar*, **1 de ellas incrementó su número a 2 bandas y 2 de ellas a 3 bandas**. Para las muestras que reaccionaban con 2 bandas, **8 de ellas evidenciaron ser positivas a 3 bandas, 3 de ellas a 4 bandas y 1 de ellas a 5 bandas**. Para las muestras que reaccionaban con 3 bandas, **4 de ellas incrementaron su número 4 bandas y 1 de ellas a 7 bandas**. Para las muestras que reaccionaban desde 4 - 6 bandas, **18 de ellas incrementaron el número de bandas presentes en diferente grado**.

La **Tabla 4** también detalla 3 muestras que siendo negativas en el protocolo *Over night* resultaron ser positivas a una banda en el protocolo *Estándar*. Así mismo, hay un total de 16 muestras que son consideradas positivas por ambos protocolos, pero donde se observa que al incrementar el tiempo de incubación disminuyen en número de bandas presentes.

Tabla 4. Diferencia entre la cantidad de bandas que reacciona cada muestra desarrollando los protocolos *Over night* (WB12H) y *Estándar* (WB1H) en simultáneo.

Cantidad de bandas reaccionadas – Protocolo WB 1H	Cantidad de bandas reaccionadas – Protocolo WB 12H								Total
	0	1	2	3	4	5	6	7	
0	93	7	9	7	1	0	0	0	117
1	3	2	1	2	0	0	0	0	8
2	0	1	6	8	3	1	0	0	19
3	0	0	3	12	4	0	0	1	20
4	0	0	1	3	2	5	3	1	15
5	0	0	0	0	1	2	2	3	8
6	0	0	0	0	2	0	3	4	9
7	0	0	0	0	0	2	3	63	68
Total	96	10	20	32	13	10	11	72	264

Como último paso en el análisis de los resultados se utilizó dos pruebas estadísticas: el Test de McNemar (**Tabla 5**) y el Test Z comparación de dos proporciones (**Tabla 6**). Los resultados en ambos test nos indican que se rechaza la Hipótesis Nula con $P < 0.05$, lo cual demuestra que los cambios entre los protocolos *Over night* y *Estándar* son significativos.

Tabla 5. Test de McNemar: Protocolo *Over night* (WB 12H) frente al protocolo *Estándar* (WB 1H).

Protocolo WB 1H	Protocolo WB 12H		Total
	Positivo (1)	Negativo (0)	
Positivo (1)	144	3	147
Negativo (0)	24	93	117
Total	168	96	264

McNemar's $\chi^2(1) = 16.33$ Prob > $\chi^2 = 0.0001$
 Exact McNemar significance probability = 0.0000

Tabla 6. Test Z – Comparación de dos proporciones. Protocolo *Estándar* (P_1) y protocolo *Over night* (P_2)

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
WB 1H	0.56	0.0305505			0.5001221	0.6198779
WB 12H	0.64	0.029542			0.5820988	0.6979012
Dif	-0.08	0.0424978			-0.1632941	0.0032941
	under Ho:	0.0426401	-1.88	0.061		

Diff = prop (WB 1H) - prop (WB 12H)
 Ho: diff = 0

Ha: diff < 0
 Pr(Z < z) = 0.0303

VI. DISCUSIONES

Los resultados obtenidos al comparar los protocolos *Estándar* y *Over night* evidencian que existe una diferencia y es significativa. Esta se comprueba experimentalmente a través de la presencia o ausencia de bandas entre un protocolo y el otro, logrando ser algunas más intensas o perceptibles por el ojo humano. La aparición de bandas se da básicamente por dos interacciones muy específicas en las que participan el antígeno-anticuerpo primario, anticuerpo primario-conjugado y finalmente una reacción óxido-reducción donde precipita un producto insoluble. Teniendo en cuenta que en las tiras de NC están distribuidos los antígenos por su peso molecular, uno puede relacionar que las bandas intensas o nuevas que han aparecido en el protocolo *Over night* son debido a la mayor cantidad o variedad de anticuerpos que han podido interactuar. Es así como uno vincula el tiempo de incubación con la mayor intensidad o cantidad de bandas presentes y lógicamente el incremento en la positividad de las muestras.

Teniendo en cuenta esta premisa, se analizaron las cifras estadísticamente obtenidas, comenzando por el porcentaje de positivos detectados que se incrementa un 7.95% a favor de protocolo *Over night* sugiriendo para este último un acrecentamiento en la detección de anticuerpos en pacientes seropositivos para cisticercosis.⁵⁰⁻⁵² Este resultado es respaldado por el *Test Z para comparación de dos proporciones*⁵⁵ que contrasta las proporciones de positivos entre ambos protocolos encontrándose significativa con un $p=0.303$. Adicionalmente, el *Test de McNemar* nos ayuda a comprobar si hay variación entre los resultados al procesar las muestras por ambos protocolos; como se puede observar el *Test de McNemar* sale significativo con $p=0.0000$ a consecuencia de que el protocolo *Over night* logra discriminar 24 muestras como positivas y 3 muestras como negativas constantando que realmente hubo cambio en los resultados.

El porcentaje de incremento en la positividad de muestras coincide con los resultados del proyecto piloto que realizamos en Julio 2011 – INCN el cual logra un aumento bastante alto de 15.385%. Sin embargo, se obtiene una discrepancia en la discriminación de las muestras negativas (pacientes con ausencia de anticuerpos para cisticercosis), estos no concuerdan con los hallados en el proyecto piloto. En los resultados encontrados actualmente hay 3 muestras que siendo negativas para el protocolo *Over night* dieron incongruentemente reacción a 1 banda cuando el tiempo de incubación fue menor, es muy probable que esto se deba a una contaminación y error metodológico. Estas 3 muestras son repetidas corrigiendo el error.

Es importante detallar que el proyecto piloto fue útil para demostrar que al separar los resultados positivos en 5 grupos (reacciones a 1 banda, 2 bandas, 3 bandas, 4 - 6 bandas y finalmente reacciones a 7 bandas), lograbas evaluar clara y definidamente el incremento en la positividad de muestras. Además se encontró que las reacciones a 4 , 5 y 6 bandas resultaban ser de baja prevalencia, por lo que se decidió agruparlos para obtener resultados más precisos y evidentes.

Continuando con el análisis de los resultados, estos revelaron que 38 muestras aumentaron el número de bandas reaccionadas, así mismo se obtuvo un acrecentamiento en el porcentaje de positividad de muestras considerable para reacciones a 3 bandas (4.55%), alejados notablemente del resto de grupos. Nuevamente estos valores son semejantes a los encontrados en el proyecto piloto los cuales indican que el porcentaje de positividad de muestras se incrementó en 5.92% para los sueros con reacciones a 3 bandas. Es interesante resaltar que a pesar del sutil incremento para el resto de grupos; 1 banda (0.76%), 2 bandas (0.38%), 4- 6 bandas (0.76%) y 7 bandas (1.52%) los 5 grupos aumentaron la positividad al desarrollar el protocolo *Over night*, justificando la diferencia global obtenida (7.95%).

Así mismo, las frecuencias acumuladas reflejan que aproximadamente un tercio de los resultados positivos tiene por lo menos reacción a 3 bandas (*Estándar* 31.97%, *Over night* 36.90%), esto posiblemente se deba a que están presentes proteínas antigénicas y de alto peso molecular (GP 50, GP 42-39 Y GP 24),⁵⁴ otros investigadores también las hacen referencia como antígenos inmunodominantes indicando que son las más reconocidas en pacientes con cisticercosis y que además la mayoría de los pacientes reconocen más de una.^{6, 56}

Entre las razones por las cuales 16 muestras aparentemente disminuyen en número de bandas reaccionadas al seguir el protocolo *Over night* se destaca la distribución de las tiras destinadas para cada protocolo previo a la adición de PBS-Tween 0.3% - 5% Leche y la muestra. Es decir, para el presente proyecto se distribuyó equivocadamente todas las tiras de un slap al protocolo *Over night* y otro grupo de tiras de un lote de slap diferente al protocolo *Estándar* ocasionando un sesgo en los resultados. Como sabemos, las proporciones físicas del gel como la densidad, elasticidad y tamaño del poro están determinadas en gran medida por las proporciones en las que Bis-acrilamida y Acrilamida se mezclan y las concentraciones en las que el APS y TEMED son incorporados como catalizadores de la reacción; si bien estas concentraciones están definidas en la metodología, el desplazamiento y la densidad de proteínas retenidas en los diferentes poros del gel no llega a ser exactamente uniforme en toda su extensión y más entre lotes de slap preparados en diferentes eventos. Existen en la literatura fuentes de error que pueden provocar alteraciones en la electroforesis como puede ser la temperatura durante la polimerización, los niveles del catalizador, pureza de los reactivos, tipo y calidad de las tiras y tiempo de desplazamiento de las proteínas que generan en conjunto un margen de error en los resultados.^{47, 48}

Por lo dicho anteriormente, la estructura del gel de poliacrilamida elaborado trae consecuencias al momento de realizar la electrotransferencia, el grado en el que los antígenos interaccionarán con los anticuerpos y la probabilidad de que finalmente pueda lograr ser perceptible al ojo humano. En tal sentido, lo correcto hubiese sido que cada una de las tiras de NC dentro de cada slap se dispongan equitativamente entre ambos protocolos. Siguiendo este último procedimiento uno podría esperar que inclusive el aumento de resultados positivos hubiera sido un poco más marcado. En este sentido y con la finalidad de obtener resultados más confiables y precisos se repitió 27 muestras que se consideraron determinantes en la investigación (3 muestras incongruentes que salieron negativas y 24 que resultaron positivas para el protocolo *Over Night* – ver **Tabla 4, Figura XIII y Figura XIV**). También se repitió algunas muestras del protocolo *Estándar* donde aparentemente las tiras no se encontraban en óptimas condiciones ver **Figura XII**. Todas las muestras procesadas por el protocolo *Estándar* obtuvieron resultados negativos corrigiéndose el error discriminando el protocolo *Over night* 97 muestras como pacientes negativos a cisticercosis. Como consecuencia, también se ajustó el incremento en la positividad de muestras (8.71%) y el aumento en la positividad de muestras considerando la reacción por número de banda; resultando para esta última bien marcadas las reacciones a 1 (4.55%) y 3 bandas (2.27%).

Se ha encontrado algunos protocolos señalando modificaciones bastante similares al presente proyecto donde el período de incubación del anticuerpo primario es de toda la noche a 4°C en lugar de 2 horas a temperatura ambiente logrando alcanzar mejores resultados (*Phospho-Akt (Ser473) Antibody #9271, Phospho-GSK-3β (Ser9) Antibody #9336, and PKCδ Antibody #2058 all perform by Cell Signaling Technology, Inc.*)⁵⁷

Adicionalmente, en la literatura se han podido hallar publicaciones relacionadas a esta patología u a otras donde mencionan en su metodología haber incubado el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C obteniendo resultados consistentes; como es el caso de la catepsina-L para diagnóstico de cisticercosis humana o el uso receptores activadores de proliferación de peroxisomas (PPAR's) en la técnica del Western blot, entre otros.^{58, 59, 61} En contraste, *Rajeshwary Ghosh, et al.*, publica en el 2014 una investigación acerca de las diferentes estrategias que uno debe emplear para mejorar la exactitud y confianza de la técnica Western blot donde recomienda en general incubaciones antígeno-anticuerpo solo entre 2-4 horas a temperatura ambiente para una mayor exactitud, intensidad de señal y confianza en los resultados, inclusive mencionan que un menor tiempo en la incubación con el anticuerpo secundario, generará un menor efecto de ruido y mayor reproducibilidad.⁶⁰ Es importante entonces tener en cuenta que no todos los resultados podrían mejorar conforme se incrementa el tiempo de incubación y que es imprescindible conocer bien las características del atígeno, la calidad del anticuerpo y la preparación de la muestra; definir bien las bandas de interés, prevenir la saturación de la señal y verificar cada uno de los procesos que involucran la estandarización correcta de la técnica⁶⁰

Teniendo estas cifras y criterios en cuenta, uno podría sugerir que para este tipo de complejo antígeno-anticuerpo en particular, la incubación a largo tiempo y baja temperatura le permite tener una interacción más estable, de mayor afinidad y/o con mayor avidez funcional donde las fuerzas débiles no covalentes como Van der Waals, Puentes de hidrógeno, Fuerzas electroestáticas y Fuerzas hidrofóbicas son protagonistas;⁶³ y que finalmente repercute en la aparición de una o más bandas de otro peso molecular.

VII. CONCLUSIONES

La presente tesis analiza estadísticamente la diferencia entre dos protocolos de Western blot *Estándar* y *Over night* diseñados para la detección de anticuerpos específicos para cisticercosis. La diferencia básica entre estos dos protocolos radica en los tiempos de incubación con el suero y conjugado donde para el *Over night* están modificados. Es importante resaltar que el protocolo *Over night* se utiliza en la actualidad como ensayo de rutina y parte metodológica en diferentes centros de investigación, no obstante a la fecha no se han reportado investigaciones consistentes, con un tamaño muestral óptimo y herramientas estadísticas suficientes que sustenten la aplicación de esta metodología y revelen bajo que términos existe mejora en los resultados.

El presente proyecto obtiene resultados que coinciden con el proyecto piloto realizado en Julio del 2011, evidenciando claramente un aumento global en la positividad de muestras (7.95%) con un incremento marcado en los sueros con reacciones a 3 bandas (4.55%) y una mayor intensidad en las bandas que permite una mejor percepción visual. Se realizaron diferentes Test que fortalecieron los resultados, entre estos se encuentran: Test de McNemar, Test Z donde los dos fueron significativos con un $p < 0.05$.

En conjunto, estos resultados sugieren el incremento en los tiempo de incubación tanto para la interacción antígeno-anticuerpo como para la interacción con el conjugado, con miras a mejorar los resultados en los estudios epidemiológicos, de investigación y de diagnóstico de cisticercosis en donde los pacientes uniuísticos, calcificados o con baja respuesta inmune, entre otros, son los más afectados.

VIII. RECOMENDACIONES

Entre los resultados obtenidos y discutidos se recomienda evaluar si solo 1 de estas 2 modificaciones son las que están afectando el proceso. Por otro lado sería interesante buscar una correlación en pacientes con NCC usando como *Gold Standar* la RM o TC y deducir si en pacientes uniuísticos o calcificados, con baja respuesta inmune, en proceso de tratamiento farmacéutico o con una evolución de quiste temprana (todos parasitológicamente confirmados); la detección de anticuerpos logra ser finalmente mayor y significativa, especialmente en términos de sensibilidad.⁶²

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. **Patricia P. Wilkins, Marianna Wilson, James C. Allan, Victor C. W. Tsang.** *Taenia solium* Cysticercosis: Immunodiagnosis of Neurocysticercosis and Taeniasis. En: *Taenia solium* Cysticercosis: From Basic to Clinical Science. London, UK: Edited by G. Singh and S. Prabhakar 2002: 329-341.
2. **Feldman M., Plancarte A., Sandoval M., et al.** Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis. Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1990. 82: 559-562.
3. **Schantz P.M., Sarti E., Plancarte A, et al.** Community-based epidemiological investigations of cysticercosis due to *Taenia solium*: comparison of serological screening test and clinical findings in two population in Mexico. Clinical Infectious Diseases. 1994. 18: 879-885.
4. **Sloan L., Schneider S., Rosenblatt J.** Evaluation of enzyme-linked immunoassay for serological diagnosis of cysticercosis. Journal of Clinical Microbiology. 1995. 33: 3124-3128.
5. **Tsang VC, Brand JA, Boyer AE.** An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). Journal of Infectious Disease 1989; 159: 50-9.
6. **Escalante H.** Evaluación de la electroinmunotransferencia (EITB) con antígenos de fluido vesicular de *Cysticercus cellulosae* para el diagnóstico de la cisticercosis humana. Tesis de Magister, Universidad de Chile. Santiago, 1992.

7. **Pereda F, Sánchez M, Cueva L.** <<Western blot modificado>> en el diagnóstico de la neurocisticercosis. Trabajo de Habilitación para Concurso de Promoción Docente, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Trujillo, 1994.
8. **Hermes Escalante.** Western blot con antígenos de fluido vesicular de larva de *Taenia solium* para el diagnóstico de la cisticercosis. En: H. H. García y S. M. Martínez. Teniasis / cisticercosis por *T. solium*. Lima, Perú. Editorial Universo S. A, 1996: 33-40.
9. **Marianna Wilson, Ralph T. Bryan, Janet A. Fried, Doris A. Ware, Peter M. Schantz, Joy B. Pilcher and Victor C. W. Tsang.** Clinical Evaluation of the Cysticercosis Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot in Patients with Neurocysticercosis. The journal of infectious diseases. (1991) 164 (5): 1007 - 9
10. **Harold W. Brown, Franklin A. Neva.** Parasitología Clínica. México D.F. Nueva Editorial Interamericana, S. A. de C. V., 4ed. 1980:171-174.
11. **David Botero / Marcos Restrepo.** Parasitosis Humanas. Mendelin, Colombia. Fondo editorial CIB, 4ed. 2003: 3-15.
12. **Jorge G. Burneo, Ian Plener, Héctor H. García.** Neurocysticercosis in a patient in Canada. CMAJ. 2009 March 17; 180(6): 639-642.
13. **Herbert Saavedra, Isidro Gonzales, Manuel A. Alvarado, Miguel A. Porras, Victor Vargas, Román A. Cjuno, et al.** Diagnóstico y manejo de neurocisticercosis en el Perú. Rev. Perú. med. exp. salud pública. Oct./Dic 2010: Vol. 27 n.4.

14. **Héctor H. García, Armando E. González, Silvia Rodríguez, Guillermo Gonzalvez, Fernando Llanos-Zavalaga, Víctor C.W. Tsang, et al.** Epidemiología y control de la cisticercosis en el Perú. Rev. Perú Med Exp. Salud Publica. 2010; 27(4): 592-97.
15. **Dimitrios K. Matthaiou, Georgios Panos, Eleni S. Adamidi, Matthew E. Falagas.** Albendazole versus Praziquantel in the Treatment of Neurocysticercosis: A Meta-analysis of Comparative Trials. Plos Negl Trop Dis. 2008 March; 2(3): e194.
16. **Cesar Náquira.** *Taenia solium*: Ciclo biológico y características En: H. H. García y S. M. Martínez. Teniasis / cisticercosis por *T. solium*. Lima, Perú. Editorial Universo S. A, 1996: 7-15
17. **Atul Kumar, Namrata Sharma.** *Taenia solium* Cysticercosis: Ophthalmic Aspects. En: *Taenia solium* Cysticercosis: From Basic to Clinical Science. London, UK: Edited by G. Singh and S. Prabhakar 2002: 269-279.
18. **Villarán MV, Montano SM, Gonzalvez G, Moyano LM, Chero JC, Rodríguez S, et al.** Epilepsy and Neurocysticercosis: An Incidence Study in a Peruvian Rural Population. Neuroepidemiology. 2009 May; 33(1): 25-31.
19. **Juan Duran Q.** Neurocysticercosis: Problemas Comunes. Revista de Neurología Clínica Especializada. Bolivia. Agosto 2004: 52-54.
20. **Agnes Fleury, Alfonso Escobar, Anhaí Chavarría, Roger Carrillo-Mezo, Edda Sciutto.** Capítulo II. Cisticercosis en el ser humano. En: Carlos Larralde, Aline S. de Alujo (coords). Cisticercosis: Guía para profesionales de salud. México, D. F. 2006: 65-75

21. **Josep Arginom.** Método de Investigación Clínica y Epidemiológica. 3ra Edición. TABLA A: 365.
22. **Natalia Rojas.** Standard Operating Procedure (SOP). 04/2007. Laboratorio de Cisticercosis, Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN), Lima, Perú.
23. **César Náquira Velarde.** Las zoonosis parasitarias en el Perú, su impacto en la economía y salud del país. AN Dr. Academia Nacional de Medicina – Anales 2006: 124-127.
24. **Nancy León, Carlos Padilla, Mónica Pajuelo, Patricia Sheen, Mirko Zimic.** Cisteinoproteasas catepsinas I de *Taenia solium*: rol biológico en la infección y potencial uso para el inmunodiagnóstico de la Neurocisticercosis. Rev Perú Med Exp Salud Publica (446 - 454).
25. **Aline S de Aluja, MSc, Raúl Suárez-Marín, MVZ, Edda Sciutto-Conde, et al.** Evaluación del impacto de un programa de control de la teniasis-cisticercosis (*Taenia solium*). Salud pública de México / vol. 56, no. 3, mayo-junio de 2014 (259 – 265).
26. **Huerta M, de Aluja AS, Fragoso G, Toledo A, Villalobos N, Hernandez M, et al.** Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. Vaccine 2001;20:262-266.
27. **Raquel Andrea Watanabe Watanabe,** Estudio de la cisticercosis porcina en el Perú - SIRVIS. Facultad de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias y Filosofía. Diciembre 2013.
28. **García HH, Gilman RH, Gonzales AE, Verástegui M, Rodríguez S. Gavidia C, et al.** Hyperendemic Human and Porcine *Taenia solium* infection in Perú. Am J Trop Med Hyg. 2003;68(3):268-75.

29. **García HH, González AE, Del Brutto OH, Tsang VCW, Llanos-Zavalaga F, et al.** 2007. Strategies for the elimination of taeniasis/cysticercosis. *J Neurol Sci.* 262(1-2): 153-157.
30. **Palacios-Flores E, Borneo-Cantalicio E.** 2008. Efecto de una intervención educativa sobre los conocimientos de Teniasis/Cisticercosis en una comunidad rural de Huánuco, Perú 2005. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* 25(3): 294-297.
31. **González AE, Gauci CG, Barber D, Gilman RH, Tsang VC, García HH, et al.** 2005. Vaccination of pigs to control human neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 72(6): 837-839.
32. **González AE, Gavidia C, Gilman RH, García HH, Falcón N, Bernal T.** 1996. Tratamiento de la cisticercosis. En: García HH, Martínez SM (eds). *Taeniasis/Cisticercosis por Taenia solium*. Lima: Ed. Universo. p109-111.
33. **Cesar Náquira.** *Taenia Solium: Ciclo Biológico y características.* En: *Teniasis/Cisticercosis por T. Solium*. Editorial Universo S.A. Lima – Perú. por H.H. García/S.M. Martínez M. 1996 pág: 7 -15.
34. **Ana Flisser, Agustin Plancartem Guillermina Avila.** Aplicación de métodos de diagnóstico de cisticercosis y teniasis a estudios epidemiológicos. En: H. H. García y S. M. Martínez. *Teniasis / cisticercosis por T. solium*. Lima, Perú. Editorial Universo S. A, 1996: 33-40.
35. **Eduardo Miranda-Ulloa, Roxana Sandoval-Ahumada, Eduardo Ayala1, Juan Vásquez-Ampuero.** Evaluación de las pruebas dot blot y aglutinación de látex para el diagnóstico de cisticercosis en Perú. *Rev Perú Med Exp Salud Pública. Original Breve.* Pág: 297-301.
36. **Schulz H.** Seropositividad a la prueba de Western blot para cisticercosis en pacientes del servicio de neurología del Hospital Regional Docente de Trujillo. Tesis de Magister, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, 1993.

37. **Nieto, D.** 1956. Cysticercosis of nervous system. Diagnostic by means of the spinal fluid complement fixation test. *Neurology* 6:725.
38. **Ueda, M.; Camargo, E.D.; Vaz, A.J.; Souza, A.M.C.; Figueiredo, R.M. and Silva, M.V.** 1988. Passive haemagglutination test for human neurocysticercosis immunodiagnosis I. Standarization and evaluation of the passive haemagglutination test for the detection of anti-*Cysticercus cellulosae* antibodies. *Rev. Inst. Med. Trop. SaoPaulo.* 30(1): 51-56.
39. **Rydsewsky, A. K., Chishlom, E.S. and Kagan, E.G.** 1975. Comparison of serological test for human Cysticercosis by indirect haemagglutination, indirect immunofluorescent antibody and agar gel precipitation test. *J. Parasit,* 61; 154155.
40. **Nahajan, RC., Chitkara, N.L. and Chapra, J.S.** 1974. Evaluation of *Cysticercus* and adult worm antigens in serodiagnosis of Cysticercosis. *Indian J. Med. Res.* 62:1310-1313.
41. **Kim, C.H. and Yang, J.** 1988. Immunological characterization of antigens from *Cysticercus* and *Sparganum* and their application to immunodiagnosis I. Immunonological characterization of crude antigenic components from *Cysticercus cellulosae*. *Korean J. Parasit.* 26:245-154.
42. **Tsang, V.C.W.; Peralta, J.M. y Simons, A.R.** 1983. Enzyme linked electrotransferblot techniques (EITB) for studing the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzymol;* 92:377-391.
43. **Kaethe Willms, Laura Vargas-Parada y Juan Pedro Laclette en el libro: Carlos Larralde, Aline S. Aluja (coord.).** Cisticercosis Guía para profesionales de la Salud. Primera Edición 2006, Cap. 1 Biología el parásito pág. 23.

44. Imagen modificado de la Fuente: **Akivo Ito, Asahikawa Medical College, Asahikawa Japan** en el capítulo: Taenia Solium: basic and Biology transmission Zbigniew S. Pawloski en el libro: Taenia Solium Cysticercosis From basic to Clinical Science. Singh, G., Prabhakar, S. 2002 pag 8.
45. Imagen sacada del libro: Human Parasitology, 4ta edición Escrito **por Burton Jerome Bogitsh, Clint Earl Carter, Thomas N. Oeltmann** 2013 pag.242.
46. **Kaethe Willms, Laura Vargas-Parada y Juan Pedro Laclette en el libro: Carlos Larralde, Aline S. Aluja (coord.).** Cisticercosis Guía para profesionales de la Salud. Primera Edición 2006, Cap. 1 Biología el parásito pág. 20.
47. **Dra. Hilda Marilín García Pérez.** Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia, Laboratorios Beterá, Univ Diag 2000;1(2):31-41.
48. **Blgo. Carlos Augusto Yábar Varas.** Manual de procedimientos de Electroforesis para proteínas y ADN, Serie de Normas Técnicas N° 38 Lima – 2003, Instituto Nacional de Salud.
49. **Dra. Luz Carbajal Arroyo.** Diplomado de Estadística en Investigación, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima Perú 2015.
50. **M.J. Burgueño, J.L García – Bastos y J.M Gonzales-Buitrago.** La curva de ROC en la evaluación de las Pruebas Diagnósticas. Manuscrito y aceptado el 18.12.1993. Med Clin (Barc) 1995; 104: 661-670
51. **Hanley JA, McNeil BJ.** The meaning and use of the area under a Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve. Radiology 1982; 143: 29-36.
52. **Swets JA.** Measuring the accuracy of diagnostic systems. Science 1988; 240: 1.285-1.293.

53. **Pita Fernández, S., Pértegas Díaz, S.** Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (España) Cad Aten Primaria 2003; 10: 120-124. Actualizada el 07/12/2010.
https://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas_diagnosticas/pruebas_diagnosticas.asp.
54. **Plancarte A, Fexas M, Flisser A.** Reactivity in ELISA and dot blot of purified GP24, an immunodominant antigen of *Taenia solium*, for the diagnosis of human neurocysticercosis. International Journal for Parasitology.
55. **Bejarano Benites Leopoldo, Mormontoy Laurel Wilfredo, Tipacti Alvarado Cesar.** Muestreo e Inferencia Estadística en Ciencias de la Salud. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Ciencias y Filosofía, 1ra Edición Diciembre 2006, Editorial Imprenta Unión. Pág. 85.
56. **Victor C.W. Tsang and Héctor García,** Immunoblot diagnostic test (EITB) for *Taenia solium* cysticercosis and its contribution to definition of this under-recognized but serious public health problem. En: García HH, Martínez SM (eds). Taeniasis/Cisticercosis por *Taenia solium*. Lima: Ed. Universo. P 259-267.
57. **Minh-Ha Lieu, Troy Humphreys, Elisabeth Antanavich, Susan Chow,** Western Blotting Protocol – ADVERTISEMENT. Cell Signaling Technology, Inc.
<https://www.jove.com/video/5072/western-blotting-protocol-advertisement>

58. **Iñaki Milton Laskibar.** Trabajo final de Master, Manejo de la técnica Western blot. Determinaciones relacionadas con obesidad y diabetes. La Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea es la universidad pública de la comunidad autónoma del País Vasco. Facultad de Farmacia.
59. **Mirko Zimic, Mónica Pajuelo, Daniel Rueda, César López, Yanina Arana, Yesenia Castillo, et al.,** Utility of a Protein Fraction with Cathepsin L-Like Activity Purified from Cysticercus Fluid of Taenia solium in the Diagnosis of Human Cysticercosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 June ; 80(6): 964–970.
60. **Rajeshwary Ghosh, Jennifer E. Gilda, and Aldrin V. Gomes.** The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of Western blots, *Expert Rev Proteomics.* 2014 October; 11(5): 549–560. doi:10.1586/14789450.2014.939635.
61. **Jennifer E. Gilda, Rajeshwary Ghosh, Jenice X. Cheah, Toni M. West, Sue C. Bodine, Aldrin V. Gomes.** Western Blotting Inaccuracies with unverified Antibodies: Need for a Western Blotting Minimal Reporting Standard (WBMRS). *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0135392 August 19, 2015.
62. **Silvia Rodríguez, Patricia Wilkins, Pierre Dorny,** Special Issue Article Immunological and molecular diagnosis of cysticercosis. *Pathogens and Global Health* 2012 VOL. 106 NO. 5 pág. 286 – 298.
63. **IBQ. Rocío Vanessa Calderón Pascasio.** Curso de Métodos Físicoquímicos en Biotecnológicos. Coordinador del curso Dr. Roberto P. Stock Silberman. Cuernavaca, Morelos, Junio 2007.

ANEXOS



Figura I. Resultados obtenidos por el protocolo *Estándar* de la muestra 155407 – 158209.



Figura II. Resultados obtenidos por el protocolo *Estándar* de la muestra 158211 – 160255.

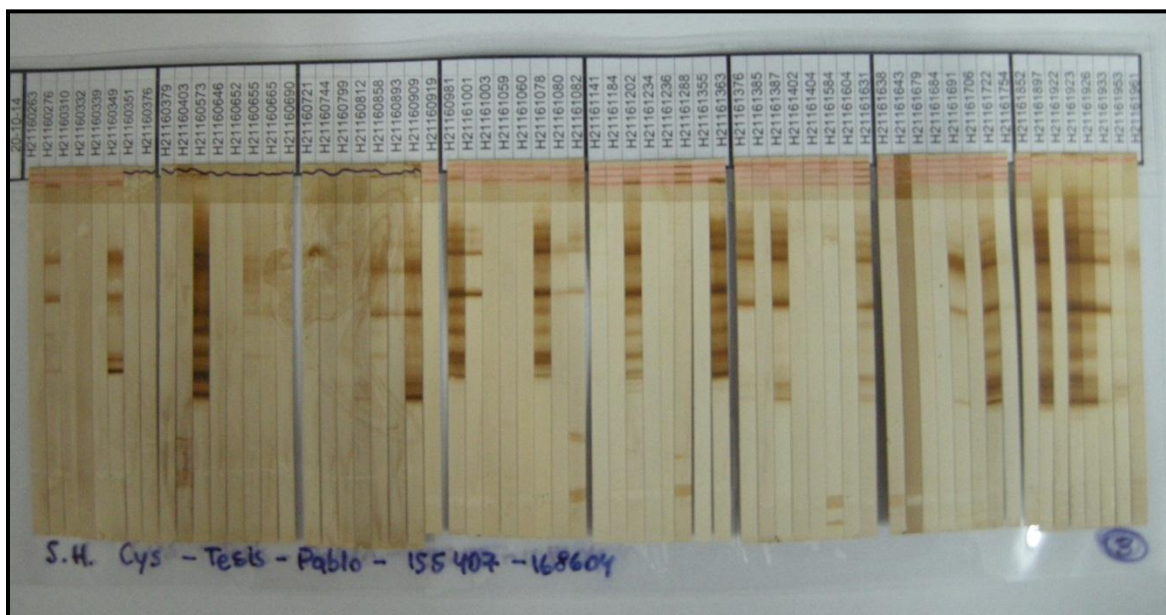
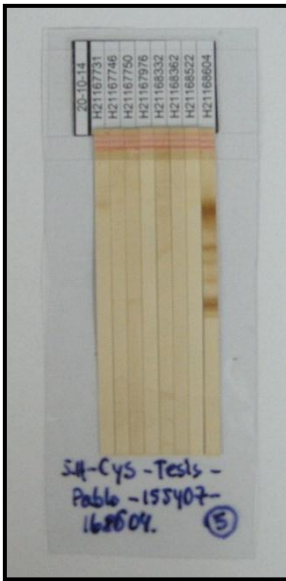


Figura III. Resultados obtenidos por el protocolo *Estándar* de la muestra 160263 – 161961.

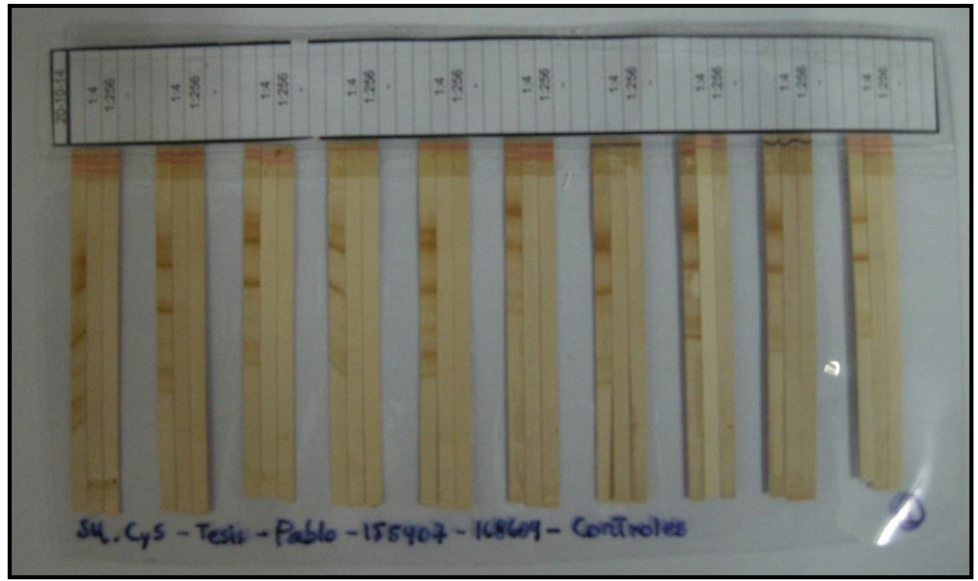


Figura IV. Resultados obtenidos por el protocolo *Estándar* de la muestra 161965 – 167725.

A



B



C

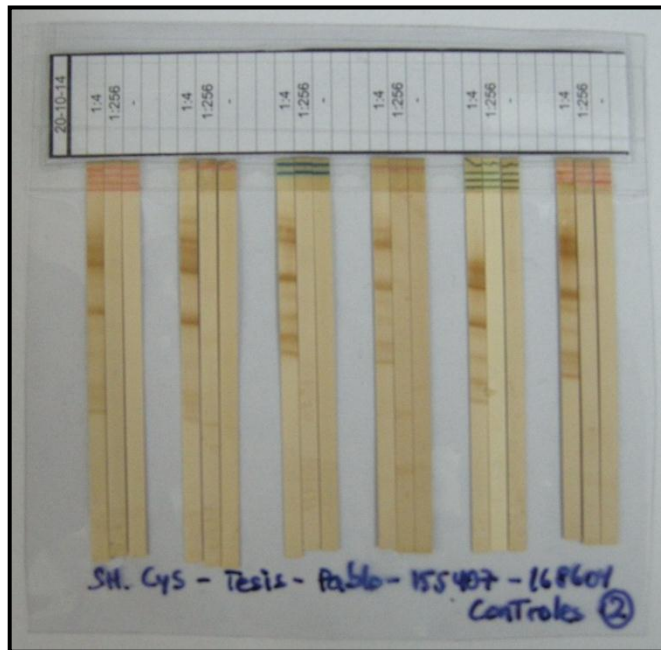


Figura V. (A) Resultados obtenidos por el protocolo *Estándar* de la muestra 167731 – 168604. (B) (C) Controles respectivos para el protocolo *Estándar*.



Figura VI. Resultados obtenidos por el protocolo *Over night* de la muestra 155407 – 158209.



Figura VII. Resultados obtenidos por el protocolo *Over night* de la muestra 158211 – 160255.



Figura VIII (A) Resultados obtenidos por el protocolo *Over night* de la muestra 160263 – 160376. (B) Resultados obtenidos por el protocolo *Over night* de la muestra 160379 – 162716.

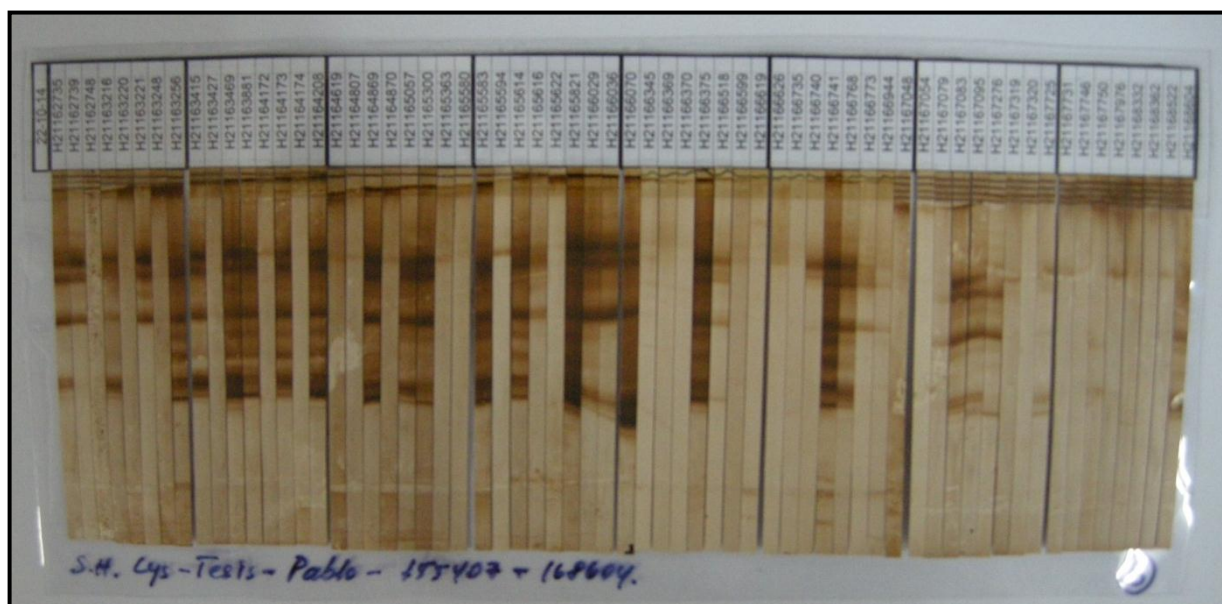
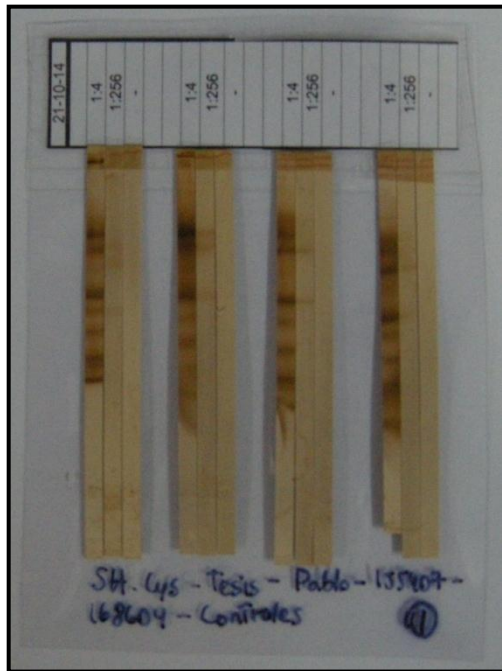


Figura IX. Resultados obtenidos por el protocolo *Over night* de la muestra 162735 – 168604.

A



B

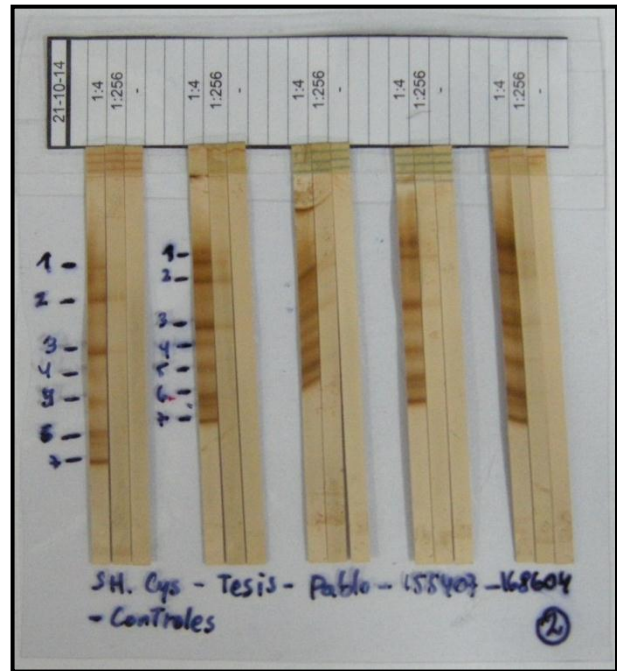


Figura X. (A) (B) Controles respectivos para el protocolo *Over night*.

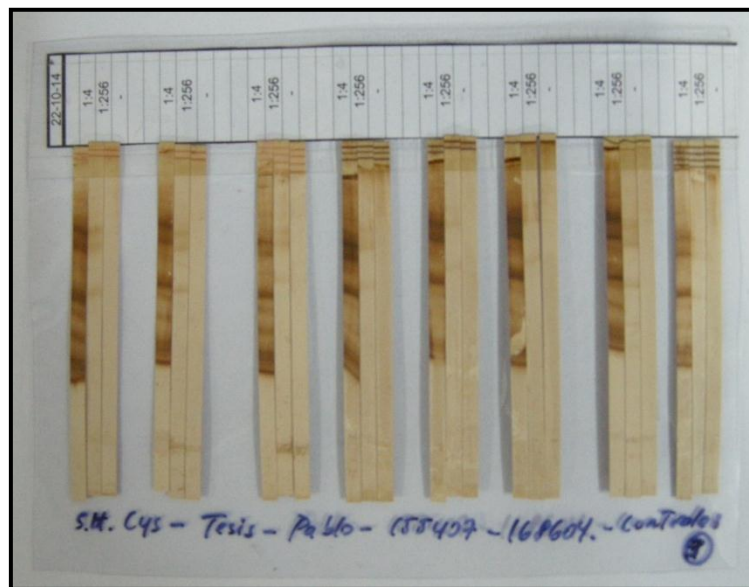


Figura XI. Controles respectivos para el protocolo *Over night*.

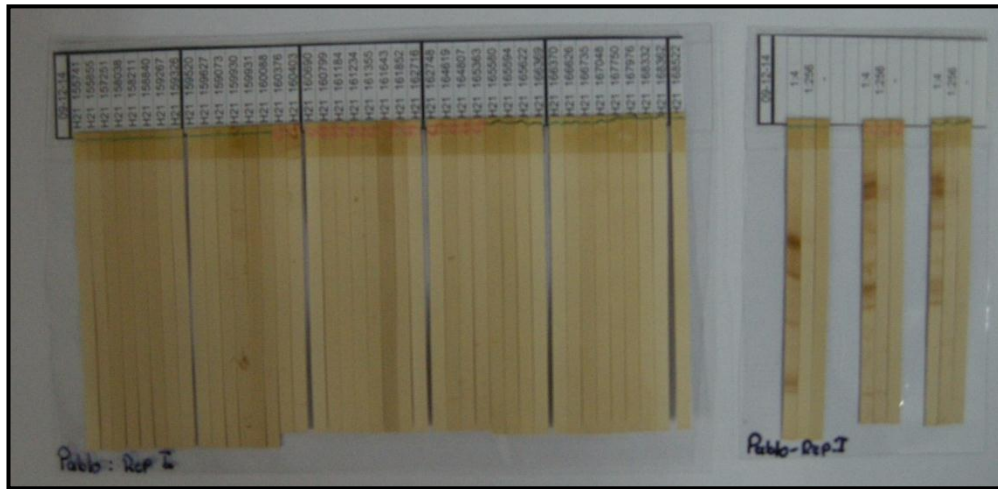


Figura XII. Repeticiones para las muestras procesadas bajo el protocolo *Estándar*.



Figura XIII. Repeticiones (27) realizadas bajo ambos protocolos *Estándar* y *Over night*.

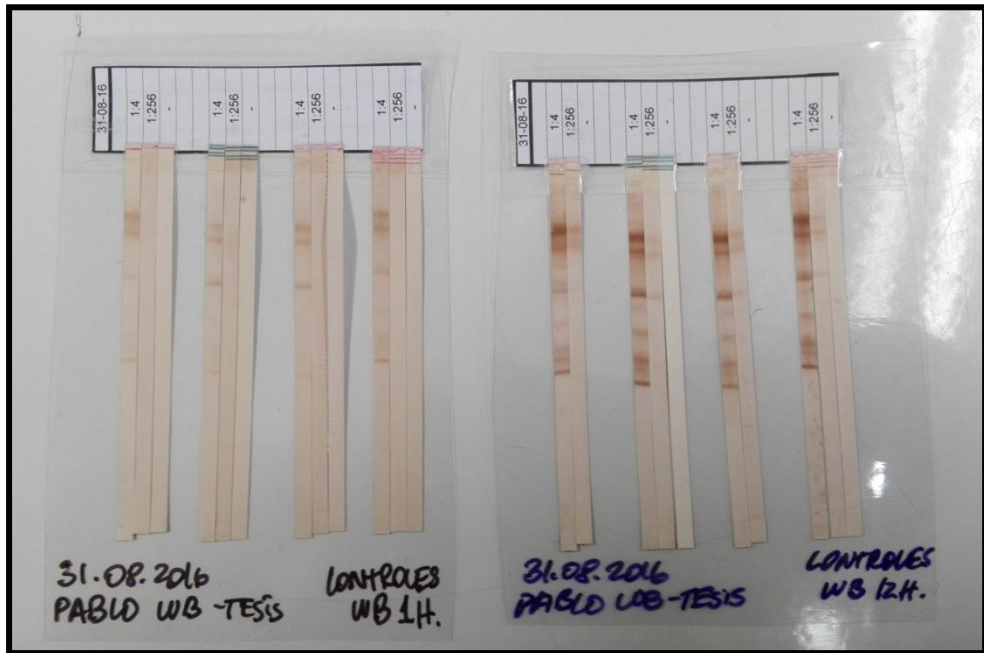


Figura XIV. Controles del slap para las 27 muestras repetidas.