



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“USO COMBINADO DE LOS PATRONES
DE BANDAS DEL ENSAYO DE
ELECTRO INMUNOTRANSFERENCIA
BLOT (EITB) Y EL ENSAYO DE ELISA
DE CAPTURA DE ANTÍGENO PARA EL
DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN VIABLE
EN NEUROCISTICERCOSIS
PARENQUIMAL HUMANA Y
CISTICERCOSIS PORCINA”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN
INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLOGICA

GIANFRANCO ARROYO HURTADO

LIMA – PERÚ

2022

ASESOR

ANDRÉS GUILLERMO LESCANO GUEVARA, MHS, MHS, PhD

FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y ADMINISTRACIÓN

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

CO ASESOR

HÉCTOR HUGO GARCÍA LESCANO, MD, PhD

CENTRO DE SALUD GLOBAL

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

JURADO DE TESIS

DRA. MONICA JEHNNY PAJUELO TRAVEZAÑO

PRESIDENTE

DRA. LUZ MARIA MOYANO VIDAL

VOCAL

DR. VITALIANO CAMA

VOCAL

DRA. FRANCESCA SCHIAFFINO SALAZAR

SECRETARIA

DEDICATORIA

A mis padres Teresa y Gerardo, por todo su apoyo y por enseñarme que el trabajo
con esfuerzo y dedicación tiene su recompensa.

A Sara, mi compañera de vida por estar siempre a mi lado apoyándome a lograr
todas mis metas y a Mateo quien ha traído un brillo de luz a mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Armando E. Gonzalez y Teresa López, mis padres académicos,
gracias por abrirme las puertas al mundo de la investigación científica.

A los Dres. Héctor H. García, Andrés G. Lescano y Javier A. Bustos por su apoyo
y mentoría durante el desarrollo del doctorado.

Al personal de la Unidad de Cisticercosis del INCN y a todos mis amigos quienes
siempre me han alentado a continuar en el camino de la investigación.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

La presente tesis ha sido financiada por el Consejo Nacional de Ciencia,
Tecnología e Innovación Tecnológica (FONDECYT/CIENCIA ACTIVA, número
de beca: EF033-235-2015). Esta tesis recibió además financiamiento parcial por el
Centro Fogarty de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos
de América (números de becas D43TW001140 y D43TW007393).



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“USO COMBINADO DE LOS PATRONES
DE BANDAS DEL ENSAYO DE
ELECTRO INMUNOTRANSFERENCIA
BLOT (EITB) Y EL ENSAYO DE ELISA
DE CAPTURA DE ANTÍGENO PARA EL
DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN VIABLE
EN NEUROCISTICERCOSIS
PARENQUIMAL HUMANA Y
CISTICERCOSIS PORCINA”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN
INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

GIANFRANCO ARROYO HURTADO

LIMA – PERÚ

2022



Informe estándar ⓘ

Informe en inglés no disponible [Más información](#)

3% Similitud estándar [Filtros](#)

4 Exclusiones →

Fuentes

Mostrar las fuentes solapadas ☐

1 Internet ⓘ

cybertesis.unmsm.edu.pe 2%

42 bloques de texto 566 palabras coincidentes

2 Publicación ⓘ

Gianfranco Arroyo, Javier A. Bust... <1%

9 bloques de texto 136 palabras coincidentes

3 Publicación ⓘ

Gianfranco Arroyo, Javier A. Bust... <1%

6 bloques de texto 104 palabras coincidentes

4 Publicación ⓘ

Eloy Gonzales-Gustavson, France... <1%

2 bloques de texto 42 palabras coincidentes

5 Publicación ⓘ

Gianfranco Arroyo, Luz Toribio, S... <1%

3 bloques de texto 42 palabras coincidentes

6 Publicación ⓘ

Javier A. Bustos, Christina M. Coy... <1%

1 bloque de texto 14 palabras coincidentes

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCION.....	1
I.1. Generalidades	1
I.2. Epidemiología	3
I.2.1. NCC humana.....	3
I.2.2. Cisticercosis porcina	6
I.3. Diagnóstico	10
I.3.1. Diagnóstico de infección viable en NCC humana	10
I.3.2. Diagnóstico de infección viable en cisticercosis porcina.....	14
I.4. Ensayo de Electro Inmunotransferencia Blot (EITB)	17
I.5. Discrepancias entre el diagnóstico de positividad a número de bandas de EITB y el diagnóstico de infección viable en NCC humana y cisticercosis porcina.....	18
I.6. Patrones de bandas de anticuerpos en el EITB.....	20
I.7. Diagnóstico de infección viable mediante detección de antígeno en NCC humana y cisticercosis porcina	22
CAPÍTULO II.....	25
JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS	25
CAPÍTULO III	29
CONTRIBUCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	29
CAPÍTULO IV	31
INVESTIGACIÓN I.....	31
IV.1. Resumen	34
IV.2. Introducción.....	36
IV.3. Materiales y métodos	40
IV.3.1. Diseño de estudio y participantes	40
IV.3.2. Procedimientos de estudio.....	41
IV.3.2.1. Neuroimágenes	41
IV.3.2.2. Electro Inmunotransferencia Blot (EITB).....	41
IV.3.2.3. ELISA de captura de antígeno (Ag-ELISA)	42
IV.3.3. Análisis estadístico	42
IV.3.4. Consideraciones éticas	44
IV.4. Resultados	45
IV.5. Discusión.....	60
CAPÍTULO V	67
INVESTIGACIÓN II	67
V.1. Resumen	70
V.2. Introducción.....	72
V.3. Materiales y métodos.....	77
V.3.1. Diseño de estudio, población y criterios de inclusión	77
V.3.2. Procedimientos de estudio	79
V.3.2.1. ELISA de captura de antígeno (Ag-ELISA).....	79
V.3.3. Procesamiento de datos y análisis estadísticos	80
V.3.4. Consideraciones éticas.....	81
V.4. Resultados.....	82

V.5. Discusión	98
CAPÍTULO VI.....	106
DISCUSIÓN INTEGRADA	106
CAPÍTULO VII.....	109
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	109
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
ANEXOS	
ANEXO 1: Análisis de clases latentes – Estudio 1	
ANEXO 2: Análisis de clases latentes – Estudio 2	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de los participantes de estudio (N = 214).....	47
Tabla 2. Estadísticos de bondad de ajuste para determinar el número óptimo de clases para los patrones de bandas de EITB en el análisis de clases latentes	49
Tabla 3. Descripción de clases* y distribución de patrones de bandas de EITB en cada clase	52
Tabla 4. Probabilidades condicionales de pertenencia a clases para cada banda y prevalencias de clases obtenidas del modelo de 4 clases en el análisis de clases latentes.....	53
Tabla 5. Características de los pacientes según patrones de bandas de EITB (clases).....	55
Tabla 6. Porcentaje de pacientes con NCC viable según resultados de Ag-ELISA y patrones de bandas de EITB.....	57
Tabla 7. Carga parasitaria cerebral con cisticercos viables en pacientes con resultados positivo o negativo a Ag-ELISA según clases* de EITB	59
Tabla 8. Características de la población porcina total y según estudio primario ..	84
Tabla 9. Estadísticos de bondad de ajuste para determinar el número óptimo de clases para patrones de bandas de EITB en el análisis de clases latentes.....	86
Tabla 10. Descripción de clases* y distribución de patrones de bandas de EITB en cada clase.....	88
Tabla 11. Probabilidades condicionales de pertenencia a clases para cada banda y prevalencias de cada clase según el modelo de 4 clases latentes	89
Tabla 12. Características de la población porcina según patrones de bandas de EITB (clases*).....	91
Tabla 13. Distribución de cerdos con cisticercosis viable según patrones de bandas de EITB y resultados de Ag-ELISA	93
Tabla 14. Niveles de antígeno en cerdos con patrones de bandas de EITB de clases 1 y 2 y positivos a Ag-ELISA según número de cisticercos viables en presencia o ausencia de <i>T. hydatigena</i> (N = 241).....	95
Tabla 15. Modelos de regresión logística * para la estimación de odds ratios de la presencia de cisticercosis viable en cerdos con patrones de bandas de EITB de clases* 1 y 2 y Ag-ELISA positivos según variables de estudio (N = 241).	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de biológico de <i>T. solium</i>	3
Figura 2. Hallazgos de neuroimágenes en NCC.....	12
Figura 3. Patrones de bandas de EITB en pacientes con NCC.....	21
Figura 4. Flujograma de selección de participantes.....	45
Figura 5. Distribución de patrones de bandas de EITB en el modelo de 4 clases latentes.....	51

RESUMEN

Introducción: El diagnóstico de infección viable en neurocisticercosis (NCC) humana permite el abordaje terapéutico apropiado del paciente y en cisticercosis porcina puede brindar información de la presencia de *Taenia solium* en el ambiente para establecer futuros programas de control. En ambos casos el diagnóstico de infección viable es complementado con la serología. La detección de una o más bandas de anticuerpos en el ensayo de Electro Inmunotransferencia Blot (EITB) es altamente sensible (~100%), pero poco específico para infección viable, aunque los patrones de bandas de EITB no ocurren al azar, su distribución refleja el perfil de inmunidad contra *T. solium* y pueden brindar información adicional sobre viabilidad. La detección de antígeno en suero permite discriminar infección viable, aunque su sensibilidad en NCC humana con infecciones viables únicas es baja y su especificidad en cisticercosis porcina es afectada por la reacción cruzada con *Taenia hydatigena*. No obstante, la combinación de los patrones de bandas de EITB y la detección de antígeno permitiría discriminar más apropiadamente cisticercosis viable en ambas infecciones.

Objetivo/métodos: Evaluamos la capacidad combinada de los patrones de bandas de EITB y resultados de Ag-ELISA para discriminar infección viable utilizando como estándar de oro diagnóstico los hallazgos de neuroimágenes (resonancia magnética [RM]/tomografía computarizada [TAC]) en pacientes con NCC parenquimal (estudio 1, n = 214) y resultados de necropsia en cerdos (estudio 2, n = 469). En ambos estudios, los patrones de bandas de EITB se agruparon en clases homogéneas mediante análisis de clases latentes y se evaluó en cada clase latente

la proporción de casos con o sin infección viable según sus resultados de Ag-ELISA (positivo/negativo) mediante la prueba exacta de Fisher.

Resultados: En ambos estudios, los patrones de bandas de EITB fueron agrupados en cuatro clases: 1 (EITB-negativos o positivos únicamente a GP50), 2 (positivos a GP42-39 y/o GP24 con o sin GP50), 3 y 4 (positivos a GP50, GP42-39, GP24, y además positivos a antígenos de 8-kDa). En el estudio 1, la combinación de los patrones de bandas de EITB y resultados de Ag-ELISA permitió identificar o descartar grupos de pacientes con NCC viable con una alta probabilidad, principalmente en la clase 2 (100% de casos Ag-ELISA positivos tuvieron NCC viable, mientras que 27.5% de casos Ag-ELISA negativos tuvieron NCC viable, $P < 0.001$), en menor medida en las clases 3 y 1, pero no en la clase 4. En el estudio 2, los resultados Ag-ELISA negativos, solos o en combinación respuestas de EITB de clases 1, 2 y 3 permitieron descartar cisticercosis porcina viable con una alta probabilidad ($\geq 97\%$), aunque la capacidad de los resultados Ag-ELISA positivos para detectar infección viable en las clases 1, 2 y 3 fue solo baja o moderada (3.7%, 27.1% y 67.9%) y no contribuyó en la clase 4 (todos los cerdos en esta clase) tenían infección viable).

Conclusiones: La combinación de los patrones de bandas de EITB (principalmente clase 2) y resultados de Ag-ELISA en entornos hospitalarios puede complementar más apropiadamente a las neuroimágenes para discriminar NCC viable y además permitiría priorizar el tamizaje imagenológico de NCC viable en zonas de escaso acceso a neuroimágenes. En poblaciones porcinas, la combinación de resultados Ag-ELISA negativos con los patrones de bandas de EITB pueden ayudar en descartar infección viable y podría ser útil para evaluar intervenciones profilácticas

o terapéuticas, pero los resultados Ag-ELISA positivos con patrones de bandas de EITB de clases 1 y 2 no discriminan adecuadamente infección viable y deben interpretarse con cautela.

PALABRAS CLAVE: Patrones de bandas de EITB, Ag-ELISA, infección viable, NCC parenquimal humana, cisticercosis porcina

ABSTRACT

Background: The diagnosis of viable infection in human neurocysticercosis (NCC) allows the appropriate therapeutic approach to the patient and in porcine cysticercosis can provide information on the presence of *Taenia solium* in the environment to establish future control programs. In both cases the diagnosis of viable infection is complemented by serology. The detection of one or more antibody bands in the Electro Immunotransfer Blot (EITB) assay is highly sensitive (~100%), but poorly specific for viable infection, although EITB banding patterns do not occur randomly, their distribution reflects the immunity profile against 3 *T. solium* antigenic families (GP50, T24/42 and 8kDa) and can provide additional information on viability. On the other hand, serum antigen detection allows to discriminate viable infection, although its sensitivity in human NCC with single viable infections is low and its specificity in porcine cysticercosis is affected by cross-reaction with *T. hydatigena*. However, the combination of EITB banding patterns and antigen detection would allow a more appropriate discrimination of viable cysticercosis in both infections.

Objective/Methods: We evaluated the combined ability of EITB banding patterns and Ag-ELISA results to discriminate viable infection using neuroimaging findings (magnetic resonance [MR]/computed tomography [CT]) in patients with parenchymal NCC (study 1, n = 214) and necropsy results in field pigs. (study 2, n = 469). In both studies, EITB banding patterns were grouped into homogeneous classes by latent class analysis and the proportion of cases with or without viable infection according to their Ag-ELISA results (positive/negative) in each latent class was assessed using Fisher's exact test.

Results: In both studies, EITB banding patterns were grouped into four classes: 1 (EITB-negative or only positive to GP50 [GP50 antigenic family]), 2 (positive to GP42-39 and/or GP24 [antigenic family T24/42] with or without GP50), 3 and 4 (positive to GP50, GP42-39, GP24, and also positive to 8-kDa antigens [GP21, GP18, GP14 and GP13]). In study 1, the combination of EITB banding patterns and Ag-ELISA results allowed us to identify or rule out groups of patients with viable NCC with a high probability, mainly in class 2 (100% of Ag-ELISA positive cases had viable NCC, while 27.5% of Ag-ELISA negative cases had viable NCC, $P < 0.001$), to a lesser extent in classes 3 and 1, but not in class 4. In study 2, negative Ag-ELISA results, alone or in combination with EITB responses of classes 1, 2, and 3 allowed to ruled out viable porcine cysticercosis with a high probability ($\geq 97\%$), although the ability of positive Ag-ELISA results to detect viable infection in EITB classes 1, 2 and 3 was only low or moderate (3.7%, 27.1%, and 67.9%) and did not contribute in class 4 (all pigs in this class had viable infection).

Conclusions: The combination of EITB banding patterns (mainly class 2) and Ag-ELISA results in hospital settings can more appropriately complement neuroimaging to discriminate viable NCC and would also allow prioritizing imaging screening for viable NCC in areas with poor access to neuroimaging. In porcine populations, the combination of negative Ag-ELISA results with EITB banding patterns (classes 1 and 2)may help to rule out viable infection and could be useful for evaluating prophylactic or therapeutic interventions, but positive Ag-ELISA results with EITB banding patterns do not adequately discriminate viable infection and should be interpreted with caution.

KEYWORDS: EITB banding patterns, Ag-ELISA, viable infection, human parenchymal NCC, porcine cysticercosis

CAPÍTULO I

INTRODUCCION

I.1. Generalidades

Taenia solium es un cestodo zoonótico con un ciclo biológico complejo que involucra la interacción de dos fases del parásito en dos hospedadores: una fase adulta (tenia intestinal) en el ser humano y una fase larvaria (cisticerco) en el cerdo que ocasionalmente puede afectar también al humano [1, 2]. El complejo teniasis/cisticercosis ocasionada por *T. solium* es endémico en muchas zonas rurales de países en vías de desarrollo donde la falta de infraestructura sanitaria y escaso conocimiento sobre la enfermedad permite que el ciclo de infección del parásito se perpetúe entre humanos y cerdos [2, 3].

El ciclo biológico de *T. solium* involucra al humano como hospedador definitivo y al cerdo como hospedador intermediario (Figura 1) [1, 4]. Los humanos desarrollan teniasis mediante el consumo de carne de cerdo infectada con cisticercos viables y luego de 2 meses aproximadamente el portador teniásico comenzará a eliminar por las heces segmentos de la tenia llamados proglotidos grávidos, los cuales contienen una gran cantidad de huevos infectivos [4]. El cerdo criado libremente en zonas rurales tendrá acceso a las heces de un teniásico y debido a su conducta coprofágica ingiere las heces conteniendo proglotidos grávidos y huevos de *T. solium* [5, 6]. Del interior de los huevos se libera la oncósfera que migrará por la circulación del cerdo [7, 8] y luego de 3 meses se desarrollará como cisticerco en la musculatura y otros órganos (cerebro, tejido ocular y subcutáneo) del cerdo [1, 4]. Es importante

mencionar, que el humano también puede convertirse en hospedador intermediario accidental de *T. solium* debido a la ingestión de huevos mediante ruta fecal-oral por el contacto con un portador teniásico cercano [9]. En humanos, la infección con cisticercos en el sistema nervioso central (SNC) se denomina neurocisticercosis (NCC). La NCC es considerada una enfermedad neurológica de gran impacto en salud pública y la principal causa de epilepsia secundaria en el mundo [3, 9, 10]. Por otro lado, la cisticercosis porcina ocasiona pérdidas económicas significativas al productor debido a la pérdida del valor comercial de la carne y su decomiso y además los cerdos infectados albergan cisticercos que potencialmente pueden adquirir la madurez (tenia intestinal) en el humano (hospedador definitivo) [9, 11].

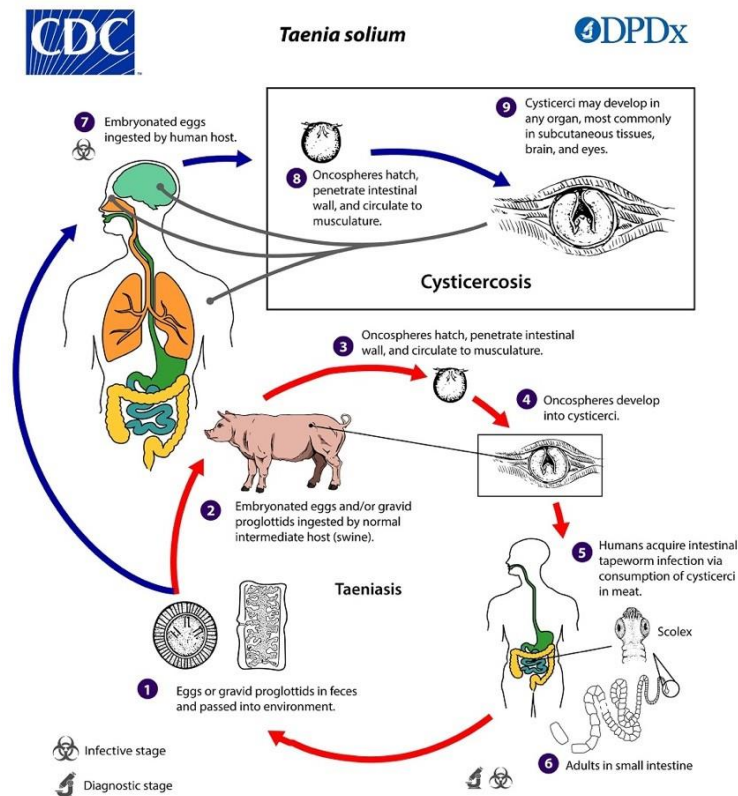


Figura 1. Ciclo de biológico de *T. solium*.
 (Imagen en inglés obtenida del portal del Centro de Control y Prevención de
 Enfermedades [CDC], Estados Unidos de América).
 Fuente: <https://www.cdc.gov/parasites/cysticercosis/biology.html>

I.2. Epidemiología

La descripción de la epidemiología de la infección por *T. solium* en la presente tesis se concentra principalmente en la NCC humana y cisticercosis porcina, y aspectos generales a nivel global para luego profundizar a América Latina y Perú.

I.2.1. NCC humana

La NCC es endémica en la mayoría de las zonas rurales de los países de escasos recursos, en los cuales coexiste la pobre infraestructura, incultura sanitaria y donde

la crianza de cerdos no tecnificada ni con control veterinario es práctica común [2, 12]. La NCC es endémica en zonas rurales del Sudeste Asiático [13-15], África Subsahariana [16-21] y Latinoamérica [10, 22] y representan un problema de salud pública significativo ya que ocasiona epilepsia a entre 0.6% a 1.8% de la población total [3]. La distribución de casos con NCC en estas regiones guarda relación con las características y hábitos de vida de cada región, lo cual también puede conllevar a diferencias en las manifestaciones de la enfermedad, como por ejemplo en India, donde la presentación del granuloma único solitario es la manifestación más común de NCC [23]. Por otro lado, en zonas industrializadas de países desarrollados la NCC es considerada una enfermedad emergente [24], con un aumento en el número de casos en los últimos años, principalmente provenientes de zonas endémicas [25], aunque la transmisión local también ha sido reportada debido a la presencia de teniásicos [26]. En Estados Unidos el número de casos con NCC fluctúa entre 1300 a 5050 por año, de los cuales casi 3/4 corresponde a población Latina [24], mientras en Europa la mayor incidencia de casos con NCC ocurre en España y Portugal, con cifras similares a las obtenidas en áreas endémicas [27].

En zonas rurales de América Latina la NCC es endémica, aunque es una enfermedad desatendida, estimándose que entre 450000 y 1.3 millones de personas sufren epilepsia debido a NCC [3]. La mayoría de los estudios de NCC en América Latina se han realizado en grupos específicos de personas como pacientes con epilepsia o positivos a serología [10, 22]. Se estima que en Latinoamérica la proporción de casos de NCC en personas con epilepsia es de 32.3% mediante tomografía axial computarizada (TAC) y 19.6% mediante serología [28]. Estudios en pacientes

hospitalarios con historial de crisis epiléptica en México, Guatemala y Honduras reportaron entre 21% a 35% de casos positivos mediante serología y 54 a 70% mediante técnicas de neuroimágenes [29-31]. Por otro lado, un estudio poblacional en adultos de una comunidad rural de Ecuador estimó una prevalencia de NCC de 9.6% mediante tomografía computarizada y se demostró además que los individuos con epilepsia tenían el triple de posibilidad de tener NCC [32].

En el Perú, la introducción de la prueba de Electro Inmunotransferencia Blot (EITB) para el diagnóstico serológico de anticuerpos en NCC permitió conducir múltiples estudios poblacionales, que indicaron tasas de seropositividad (presencia de una o más bandas de EITB) entre 10-20% [33]. Un estudio inicial realizado en muestras de suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes neurológicos del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN) de Lima determinó mediante análisis de EITB un 12% de seropositividad contra cisticercosis [34, 35], mientras que otro estudio realizado en comunidades de Huancayo, Junín, una región hiperendémica de la sierra del Perú estimó una seroprevalencia de NCC humana de 13.9% en población general [36]. Asimismo, un estudio realizado en la población rural adulta de una comunidad rural de Tumbes en la costa norte del Perú y considerada zona endémica a cisticercosis reportó una prevalencia de NCC de 13.8% mediante TAC, observándose, además que más del 80% de los casos positivos fueron asintomáticos y únicamente presentaban lesiones inactivas [37]. Por otro lado, las tasas de seropositividad a cisticercosis parecen ser más altas en población rural que en población migrante o urbana, observándose, además asociación entre

seropositividad y epilepsia en población rural, pero no en migrantes o población urbana [38].

I.2.2. Cisticercosis porcina

La cisticercosis porcina es endémica en zonas rurales de Latinoamérica, África no musulmana y sudeste asiático, donde la crianza de cerdos no tecnificada y las escasas condiciones de saneamiento debido a pobreza y falta de infraestructura favorecen el contagio con *T. solium* [2, 39]. La cisticercosis porcina también ha sido reportada en Europa. La enfermedad era endémica en Alemania y Dinamarca, aunque la tecnificación del sistema de crianza de cerdos y la inspección sanitaria en camales ayudó a su eliminación a inicios del siglo XX [40]. En Europa del Este se han reportados casos de cisticercosis porcina, aunque la falta de diferenciación de especies de tenia sugiere problemas en la notificación de la enfermedad [41]. En Portugal, se han reportado dos casos confirmados de cisticercosis porcina mediante análisis molecular, lo cual sugiere que en estas zonas es posible la transmisión y establecimiento del complejo zoonótico teniasis/cisticercosis [42].

La cisticercosis porcina es endémica en muchas zonas rurales de América Latina. No obstante, la mayor parte de la información se basa en registros de camales y mataderos, por lo cual la situación real podría ser mucho peor en las comunidades, en donde la matanza de cerdos se da principalmente en el traspatio [43]. Los registros históricos en camales de Brasil han reportado tasas de cisticercosis porcina de 0.83% entre los años 1970-1973, y valores similares han sido obtenidos en Chile y Colombia [40]. Estudios en la década de 1990 en Centroamérica y regiones del Caribe, han reportado porcentajes de infección con cisticercosis porcina de 30% en

Honduras mediante serología [44], mientras que en Guatemala se han reportado prevalencias de 4 a 14% mediante examen de lengua en cerdos [45]. La falta de notificación de cisticercosis en otros países de Centroamérica sugiere la subnotificación de la enfermedad [46]. En México, una encuesta de campo determinó un 23% de cerdos infectados mediante examen de lengua y 35% mediante serología [47]. Por otro lado, un estudio en comunidades rurales del estado de Minas Gerais, Brasil reportó una seroprevalencia de 5.3% de cisticercosis porcina, encontrándose además un mayor riesgo de positividad en zonas en donde ocurre defecación al aire libre [40], mientras que una prevalencia mucho más alta fue reportada en un estudio realizado en zonas rurales de la región del Chaco Boliviano, con un 37% de seropositividad [48].

En el Perú, la mayoría de los estudios epidemiológicos de cisticercosis porcina han utilizado EITB para la detección de anticuerpos, habiéndose reportado prevalencias de 28% a 43% en la selva [33], de 11.5% a 45% en la costa norte [49] y hasta 75% en la sierra [36], considerándose algunas de estas zonas hiperendémicas a *T. solium* [36]. Asimismo, un estudio de 1993 en una región endémica de la sierra del Perú encontró que las prácticas de sacrificio en mataderos y mercadeo oficial de la carne de cerdo no eran seguidas ni fiscalizadas, con un 48% de comercio de carne de tipo informal y con un 23% de la carne comercializada proveniente de cerdos infectados [43]. Los estudios epidemiológicos realizados en zonas rurales de la costa del Perú han permitido identificar los patrones de distribución de cisticercosis porcina, observándose un fenómeno de agregación en donde la mayoría de los cerdos infectados presentan infecciones leves, mientras que una menor proporción

presentan altas cargas parasitarias [50]. Asimismo, estudios realizados en zonas endémicas en la costa norte del Perú han demostrado asociación espacial entre focos de cerdos con cisticercosis porcina viable con la presencia de un portador teniásico cercano (50-100 metros), lo que a su vez brinda evidencia para la implementación de estrategias focalizadas de diagnóstico y tratamiento de teniásicos alrededor de focos de cisticercosis porcina para controlar la transmisión de *T. solium* [51].

I.3. Sintomatología clínica de la NCC humana

Las manifestaciones clínicas que ocurren en la NCC humana se deben al compromiso cerebral de la infección y al desarrollo y exacerbación de la respuesta inflamatoria. A su vez, el espectro de manifestaciones clínicas en los pacientes con NCC depende tanto de las características del parásito (localización, fase de desarrollo y carga parasitaria en el SNC) así como de la respuesta inmune del hospedador contra el parásito [1, 10]. Las manifestaciones clínicas pueden variar desde infecciones totalmente asintomáticas hasta morbilidad severa e incluso muerte.

La epilepsia de inicio tardío es la manifestación clínica más común en NCC humana, ocurre principalmente en pacientes con cisticercos cerebrales intraparenquimales y en muchas ocasiones representa el único síntoma de la enfermedad. En zonas endémicas a *T. solium* la NCC está presente en alrededor del 30% de los pacientes que manifiestan crisis epilépticas [9]. Las crisis convulsivas recurrentes ocurren en alrededor de 80% de los casos sintomáticos con NCC

parenquimal [16, 52]. La mayoría de las crisis epilépticas son de tipo parciales, no obstante, algunas de estas crisis pueden presentar generalización secundaria [53].

Los mecanismos relacionados al desarrollo de crisis epileptogénicas en pacientes con NCC parenquimal son aún materia de estudio, aunque parecen involucran la activación de la respuesta inmune contra el cisticerco y desarrollo de inflamación [54]. Los individuos con NCC parenquimal viable pueden permanecer asintomáticos por un período de tiempo prolongado (meses o años), luego del cual el parásito pierde su capacidad de evadir al sistema inmune del hospedador y como consecuencia se inicia un proceso de inmunoreacción y desarrollo de inflamación, lo que finalmente conduce a la degeneración y muerte del parásito [54, 55]. Algunos cisticercos desaparecen o se resuelven, mientras que otros se convierten en calcificaciones residuales, las cuales pueden eventualmente desarrollar edema perilesional y convertirse en focos epileptogénicos [54, 56]. Por otro lado, el tratamiento antiparasitario también puede desencadenar el inicio de inflamación aguda, por lo cual debe ir acompañado de terapia antiepiléptica y antiinflamatorios [1].

Otras manifestaciones clínicas menos frecuentes en NCC incluyen el déficit neurológico focal (aproximadamente 15% de los casos), déficit cognitivo (5%) y el incremento en la presión intracraneal (12%) [52]. La hipertensión intracraneal generalmente se debe a la NCC extraparenquimal [1, 52, 57]. En pacientes con NCC extraparenquimal los cisticercos tienen localización subaracnoidea o ventricular, generalmente en la base del cerebro, en la fisura de Silvio o en las convexidades y

pueden alcanzar un gran tamaño [58]. En estos pacientes, el desarrollo de crisis epilépticas es menos frecuente, mientras que el desarrollo de hidrocefalia e hipertensión intracraneal es más común debido al efecto en masa que ocasionan y al bloqueo del drenaje de líquido cefalorraquídeo [57, 59]. Por ello, la morbilidad y mortalidad es considerable, por lo que algunos casos con NCC extraparenquimal requieren intervención quirúrgica. Por otro lado, la cisticercosis extra-cerebral, como por ejemplo los cisticercos localizados en el sistema ocular puede ocasionar algunas manifestaciones clínicas como pérdida de visión, uveítis, vitritis, proptosis entre otros, mientras que la cisticercosis muscular y subcutánea es principalmente asintomática, aunque en casos de infección masiva puede presentarse dolor y fatiga muscular en los pacientes [58].

I.3. Diagnóstico

La sección de diagnóstico en la presente tesis se centra en el diagnóstico de infección viable, tanto en NCC humana como en cisticercosis porcina, al ser las dos enfermedades que componen los estudios 1 y 2 respectivamente.

I.3.1. Diagnóstico de infección viable en NCC humana

El diagnóstico de infección viable en NCC se da principalmente en pacientes hospitalarios sintomáticos, lo cual contrasta con el diagnóstico de NCC en población general en donde el mayor porcentaje de casos con NCC son asintomáticos y presentan lesiones inactivas [32, 37]. El diagnóstico de NCC viable en pacientes hospitalarios permite el abordaje terapéutico adecuado mediante el uso

de esquemas de tratamiento con antiparasitarios altamente eficaces con albendazol y praziquantel y un manejo clínico apropiado mediante el uso de antiinflamatorios y antiepilépticos [9, 60, 61]. La terapia antiparasitaria favorece la muerte y resolución del cisticerco cerebral, lo cual a su vez ayuda en la mejora de la evolución clínica del paciente [60].

El diagnóstico clínico de NCC viable es difícil de realizar debido a la gran variedad de manifestaciones clínicas que presentan los pacientes hospitalarios, mientras que en población general generalmente los casos son asintomáticos. El diagnóstico de viabilidad en NCC humana en entornos hospitalarios se basa principalmente en los hallazgos de neuroimágenes en combinación con los resultados de pruebas serológicas [62, 63]. Tanto la resonancia magnética (RM) como la tomografía axial computarizada (TAC) proporcionan evidencia objetiva sobre la presencia de cisticercos en el SNC, su localización, número, fase de desarrollo y el grado de respuesta inflamatoria alrededor [1, 63] (Figura 2). La RM es más sensible para el diagnóstico de NCC viable (tanto en infecciones parenquimales como extraparenquimales), ya que permite visualizar las lesiones en diferentes planos, mientras que la TAC es más sensible para detectar lesiones cerebrales calcificadas, aunque su sensibilidad en infecciones viables es menor [9, 63].

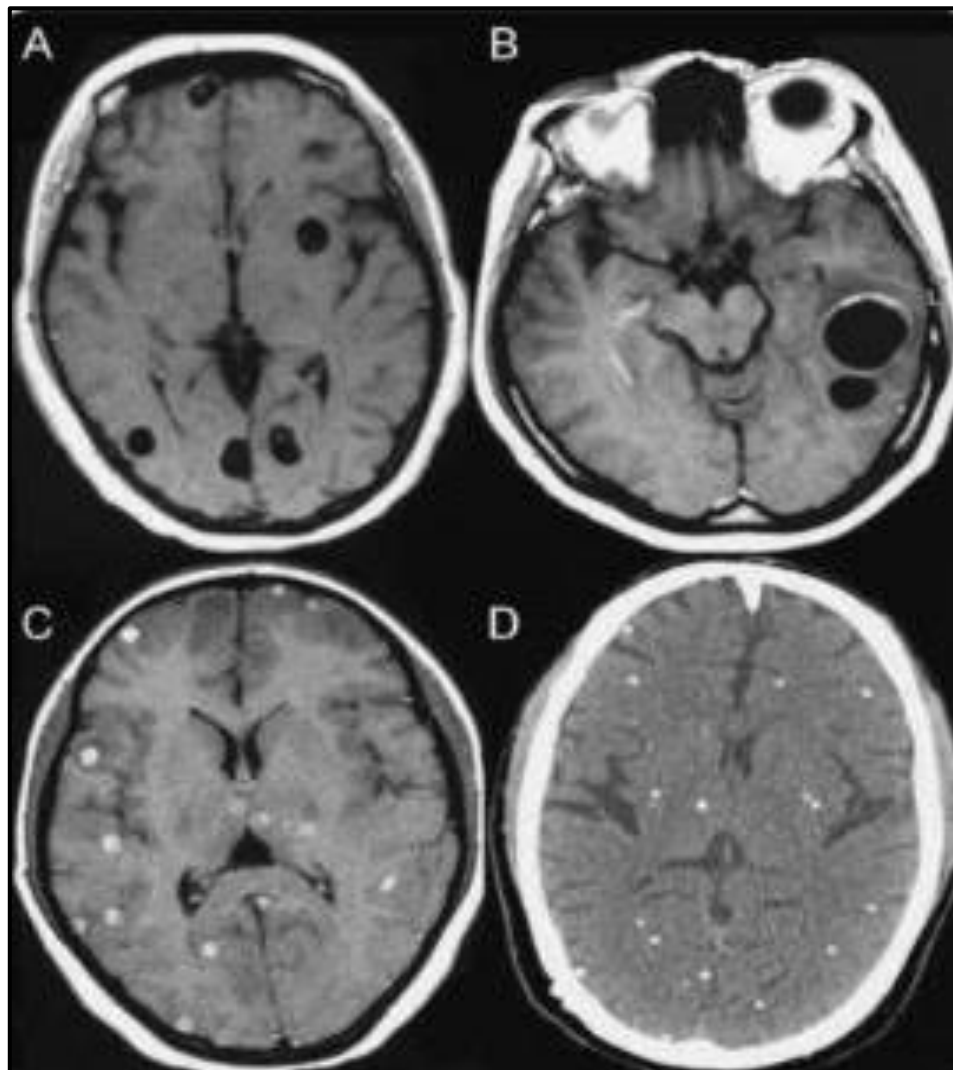


Figura 2. Hallazgos de neuroimágenes en NCC. (A, B) visualización de cisticercos viables en resonancia magnética; (C, D) presencia de calcificaciones parenquimales en tomografía computarizada (Imagen cortesía del Dr. Héctor García, Unidad de Cisticercosis, Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas de Lima, Perú)

El diagnóstico de viabilidad en NCC humana considerando únicamente a las neuroimágenes como herramienta diagnóstica solo es definitivo cuando los hallazgos de neuroimágenes indican la presencia de un cisticercos con su escólex invaginado [1, 9, 62]. Además, las neuroimágenes no siempre pueden diferenciar

NCC de otras lesiones en el SNC y en ocasiones, algunas lesiones pueden pasar desapercibidas por la TAC o la RM. Cuando los hallazgos de neuroimágenes como la TAC o RM no son concluyentes o no se cuentan con técnicas precisas para medir viabilidad como la RM, éstas requieren confirmación mediante pruebas serológicas, las cuales proporcionan información adicional sobre la viabilidad del cisticerco y pueden apoyar a los hallazgos de neuroimágenes para determinar la opción de tratamiento adecuado en el paciente [9, 64]. Sin embargo, es importante considerar que en ausencia de neuroimágenes, los resultados de serología no pueden dictaminar la decisión sobre el manejo terapéutico del paciente [65].

Con respecto al diagnóstico serológico en NCC humana, los ensayos de detección de anticuerpos son comúnmente preferidos debido a su alta sensibilidad. El ensayo de preferencia para detección de anticuerpos en NCC humana es el ensayo de Electro Inmunotransferencia Blot (EITB) que detecta bandas de anticuerpos dirigidos contra siete glicoproteínas del cisticerco de *T. solium* purificadas en lentil-lectina y separadas según su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida [66]. El EITB ha sido preferido para el estudio serológico de NCC debido a su alta sensibilidad y especificidad inicialmente reportada para un resultado positivo a 1 o más bandas (98% y 100%) por lo cual se prefiere como herramienta complementaria a los hallazgos de neuroimágenes [66, 67]. Existen además formatos comerciales de inmunoabsorbancia ligada a enzima (ELISA) de detección de anticuerpos, aunque utilizan antígenos menos purificados en comparación al EITB, lo que resulta en una menor sensibilidad y en un alto

porcentaje de falsos positivos debido a la reacción cruzada con otros cestodos como *Hymenolepis nana* y *Echinococcus granulosus* [68].

A diferencia del EITB de detección de anticuerpos, la detección de antígeno en suero puede indicar la presencia de infección viable en el hospedador mediante el reconocimiento de productos excretorios/secretorios del parásito [69]. Los primeros reportes de ensayos de detección de antígeno para cisticercosis se basaron en el uso de anticuerpos policlonales, los cuales funcionan mejor en líquido cefalorraquídeo que en suero. El desarrollo posterior de anticuerpos monoclonales mejoró notablemente la especificidad de los ensayos de detección de antígeno como herramienta diagnóstica para NCC con niveles aceptables de sensibilidad y especificidad (entre 82-85.7 y 87.5-92% respectivamente) [70, 71]. A diferencia de la detección de anticuerpos mediante EITB cuyos niveles de sensibilidad son determinados por la respuesta inmune del hospedador, la sensibilidad de los ensayos de detección de antígeno generalmente es menor, ya que depende directamente de la cantidad de antígeno producido por el parásito [69] siendo esta menor en infecciones cerebrales únicas. Asimismo, los niveles de antígeno en pacientes con NCC puede caer rápidamente luego de tratamiento antiparasitario, por lo cual los ensayos de detección de antígeno son utilizados también para monitorear la eficacia post-tratamiento antiparasitario [72].

I.3.2. Diagnóstico de infección viable en cisticercosis porcina

El diagnóstico de infección viable en cisticercosis porcina constituye una herramienta valiosa en las estrategias de prevención y control, ya que indica la

presencia de *T. solium* en el medio ambiente y además el diagnóstico de infección viable permitiría evaluar la eficacia de intervenciones terapéuticas o profilácticas para cortar el ciclo de transmisión de *T. solium* entre humanos y cerdos [11, 73].

El diagnóstico de infección viable en cisticercosis porcina puede realizarse evaluación post-mortem y ante-mortem respectivamente. La necropsia y examen post-mortem de carcasas es el estándar de oro para el diagnóstico de cisticercosis porcina, el cual permite la visualización directa de cisticercos, su fase de desarrollo (cisticercos viables o degenerados), así como la carga parasitaria [74, 75]. La información obtenida mediante examen de necropsia en cerdos en una comunidad del norte del Perú permitió demostrar que los casos de cisticercosis son agregados, con un alto porcentaje de cerdos expuestos, pero no infectados, en comparación a los cerdos con infección viable y un porcentaje aún menor de aquellos cerdos tienen altas cargas parasitarias [76]. No obstante, la necropsia involucra la compra de los animales para su sacrificio, malogra la canal y demanda tiempo y recursos para su implementación por lo que resulta virtualmente impráctico en intervenciones de campo [11, 77]. Los reportes de camal también pueden proporcionar información sobre cisticercosis porcina viable, aunque estos pueden subestimar el nivel de infección real en la población porcina, lo que a su vez permite que el ciclo de transmisión de *T. solium* se perpetúe en la comunidad. Con respecto a métodos de detección ante-mortem, el examen de lengua tiene moderada sensibilidad (~70%) cuando es realizada por personal entrenado y en cerdos con altas cargas parasitarias, aunque su sensibilidad se reduce en cerdos con cargas parasitarias moderadas y bajas [75]. Por otro lado, la ultrasonografía, aunque específica (alrededor de 90%),

presenta únicamente sensibilidad alta (100%) en cerdos con altas cargas parasitarias, mientras que en infecciones leves o moderadas su sensibilidad es baja (65% o menos) [78].

El uso de pruebas serológicas para el diagnóstico ante-mortem de viabilidad en cisticercosis porcina viable ha permitido la ejecución de diferentes estudios epidemiológicos, ya que el muestreo de sangre en cerdos en dichos estudios fue más aceptable por lo propietarios que el muestreo de sangre en humanos, además que la estimación de las tasas de infección en la población porcina constituye una herramienta valiosa para el monitoreo del nivel de contaminación ambiental con *T. solium* [11, 79]. Al igual que en NCC humana, el EITB es considerado el ensayo referencial para el diagnóstico serológico en cisticercosis porcina [74]. Los estudios basados en el uso de EITB en cerdos han permitido obtener más información sobre la epidemiología de la cisticercosis porcina en zonas endémicas [36]. Por otro lado, la detección de antígeno en cisticercosis porcina permite discriminar la presencia de infecciones viables, siendo de gran importancia dado que los cerdos con cisticercos viables constituyen el reservorio de teniasis. Los formatos de detección de antígeno basados en el uso de anticuerpos monoclonales contra productos excretorios/secretorios inicialmente desarrollados contra *T. saginata* han sido los más utilizados para el estudio de cisticercosis porcina tomando como ventaja la reacción específica de género (*Taenia*) [80, 81]. No obstante, uno de los principales inconvenientes de los ensayos serológicos en cisticercosis porcina es la baja especificidad para discriminar infección viable tanto para EITB como Ag-ELISA [75, 82].

I.4. Ensayo de Electro Inmunotransferencia Blot (EITB)

El diagnóstico serológico referencial contra cisticercosis (humana y porcina) es el ensayo de EITB de detección de anticuerpos contra siete antígenos glicoproteicos del cisticerco de *T. solium* obtenidos mediante purificación en electroforesis con lentil-lectina [66, 83]. Las bandas de glicoproteínas en el EITB son denominadas según su peso molecular en kilodaltons como GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13 [66].

El ensayo de EITB está conformado por los siguientes procesos. El primero es la consiste en la separación de antígenos previamente obtenidos de extractos antigénicos del cisticerco de *T. solium* mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, lo cual permite la migración de las glicoproteínas antigénicas en el gel según su peso molecular. El segundo proceso consiste en la transferencia de las glicoproteínas contenidas en los geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa. El tercer proceso consiste en la incubación que permite la unión de los anticuerpos anti-*T. solium* en suero de humano o cerdo con los antígenos glicoproteicos contenidos en las tiras, para lo cual las tiras obtenidas a partir de las membranas de nitrocelulosa y cargadas con las glicoproteínas son incubadas con muestras de suero (humano o porcino) durante toda la noche, y luego de un posterior paso de incubación con anti-IgG (humano o porcino según el tipo de suero) y revelado se visualizan las bandas de anticuerpos.

El diagnóstico inicialmente establecido para positividad a cisticercosis mediante el ensayo EITB involucra la visualización de 1 o más bandas de anticuerpos reactivos

contra las glicoproteínas antigénicas de *T. solium*. Los estudios inicialmente considerando este punto de corte diagnóstico de EITB reportaron niveles altos de sensibilidad y especificidad en NCC humana (98% y 100% respectivamente) [66, 67] y en cisticercosis porcina (100% y 100% respectivamente) [74]. A partir de ello, se consideró a la detección de una o más bandas de anticuerpos en el EITB como herramienta complementaria a las neuroimágenes para confirmar el diagnóstico de NCC en pacientes hospitalarios y como herramienta de tamizaje para el diagnóstico de cisticercosis porcina en estudios epidemiológicos para estimar el nivel de exposición a *T. solium*.

I.5. Discrepancias entre el diagnóstico de positividad a número de bandas de EITB y el diagnóstico de infección viable en NCC humana y cisticercosis porcina

Debido a que el ensayo de EITB de detección de anticuerpos no fue desarrollado originalmente para discriminar infección viable, estudios posteriores han demostrado la falta de correlación entre la presencia de una o más bandas de EITB con el diagnóstico de viabilidad mediante hallazgos de neuroimágenes en NCC humana [64] y resultados de necropsia en cisticercosis porcina [82], por lo que en ambos escenarios la especificidad de una o más bandas de EITB es poco específica para definir el estado de viabilidad de los cisticercos.

Diferentes factores pueden afectar principalmente la especificidad del EITB para el diagnóstico de viabilidad en NCC humana y cisticercosis porcina. En NCC humana, los anticuerpos en el EITB de pacientes pueden persistir en presencia de infecciones

no viables (lesiones inactivas o calcificaciones residuales) e incluso pueden persistir más de 12 meses en algunos pacientes luego de la resolución del parásito en el SNC [64, 84] e incluso pueden deberse a infecciones extra-cerebrales [1] lo que afecta su especificidad para discriminar viabilidad. Un incremento en el punto de corte de número de bandas de EITB mejora su especificidad para discriminar infección viable (4 o más bandas, especificidad: 87.1%), aunque esto ocasiona además una reducción significativa de su sensibilidad (de 100% a 57%) [85].

Por otro lado, la detección de una o más bandas de anticuerpos de EITB en cisticercosis porcina es poco específica para discriminar viabilidad y es principalmente considerado como un indicador de exposición a *T. solium*, más no un indicador de infección viable [86]. Si bien el estudio inicial de Gonzalez et al reportó 100% de sensibilidad y 100% de especificidad mediante la detección de una o más bandas de EITB para infección con cisticercos [74] estudios posteriores demostraron menor precisión diagnóstica [82, 86, 87]. Por ejemplo, un estudio en México reportó bajos niveles de sensibilidad y especificidad del EITB en cerdos naturalmente infectados con bajas cargas parasitarias (64.7% y 59.1% respectivamente) [86], mientras que un estudio de necropsia en cerdos en la costa norte del Perú reportó una sensibilidad de 88.9% y especificidad de 48.3% para una o más bandas de EITB [82]. Adicionalmente, la alta prevalencia de anticuerpos contra cisticercosis en cerdos de zonas endémicas reduce considerablemente el valor predictivo positivo del EITB para infección viable [50]. Las bandas de anticuerpos en el EITB en cerdos naturalmente infectados pueden deberse a infecciones viables, pero también pueden persistir en infecciones degeneradas,

infecciones resueltas, exposiciones pasadas [50, 88], e incluso pueden persistir en lechones debido al fenómeno de inmunidad pasiva [89], lo que en conjunto afecta su especificidad para detectar infección viable. Incrementos en el punto de corte de positividad a número de bandas de EITB en cerdos también ha sido sugerido (3 o más bandas) para mejorar su especificidad para discriminar infección viable, aunque el rendimiento diagnóstico global del ensayo de EITB con este punto de corte solo es moderado (sensibilidad: 77.7%, especificidad: 74.6%) [82].

I.6. Patrones de bandas de anticuerpos en el EITB

La categorización de resultados positivos o negativos a número de bandas de EITB no es del todo adecuada para el diagnóstico de viabilidad, principalmente por su poca especificidad, tanto en NCC humana como en cisticercosis porcina. No obstante, es importante mencionar que las glicoproteínas antigénicas del cisticerco de *T. solium* contenidas en el ensayo de EITB pertenecen a tres familias antigénicas, denominadas GP50, T24/42 y 8-kDa, las cuales presentan características propias de estructura y función [90-92]. Brevemente, la familia antigénica GP50 incluye un grupo de proteínas glicosiladas de tipo transmembrana contenidas en la banda de 50-kDa del EITB [91]. La familia antigénica T24/42 incluye un conjunto de proteínas miembros de la superfamilia de tetraspaninas (proteínas encargadas de procesos de anclaje, andamiaje tisular y proliferación celular) [92, 93]. Las proteínas de la familia T24/42 migran hacia la banda GP24 del EITB y como homodímeros hacia la banda GP42-39 [92]. Por último, la familia antigénica de 8-kDa incluye un conjunto de glicoproteínas de naturaleza excretoria/secretoria con aparente función evasora de la respuesta inmune y que migran hacia las bandas de

menor peso molecular del EITB (GP21, GP18, GP14 y GP13), aunque ocasionalmente también pueden migrar hacia las bandas GP24 y GP42-39 del EITB [90] (Figura 3).

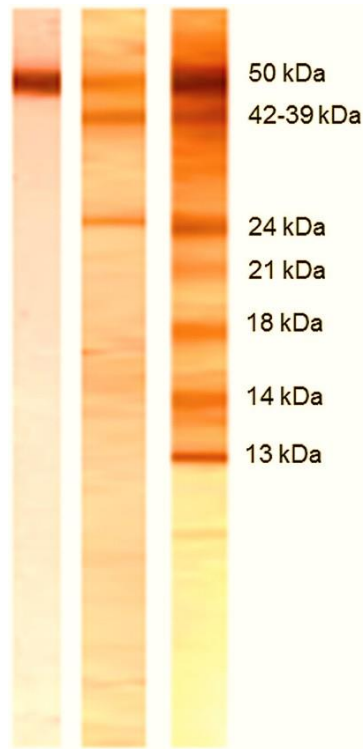


Figura 3. Patrones de bandas de EITB en pacientes con NCC.
(Imagen obtenida de Arroyo *et al.*, 2017)

Debido a las diferencias en las características y función de las familias antigénicas de *T. solium* en el EITB, la cantidad de bandas de anticuerpos contra estas familias antigénicas en el EITB no debe ser interpretada únicamente de modo aditivo, ya que además del número de bandas, los patrones de bandas de EITB (es decir, la combinación de resultados dicotómicos [presencia/ausencia] de cada banda) no ocurre al azar como se han observados en estudios previos en pacientes con NCC y en población porcina y parecen reflejar el perfil de respuesta inmunológica contra

los antígenos que reaccionan y podrían brindar información sobre el tipo de infección en el hospedador, siendo algunos patrones de bandas de EITB más predictores de infección viable [87]. Esto ha sido reportado en un estudio previo que demostró asociación entre los patrones de bandas de EITB y los hallazgos de neuroimágenes compatibles con infección viable en pacientes con NCC [94], pero no ha sido evaluado en detalle en cerdos naturalmente infectados. Asimismo, diferencias en la heterogeneidad en los patrones de bandas en cisticercosis porcina en comparación a NCC humana pueden deberse a factores como una mayor dosis de infección infectiva, el período de vida más corto en cerdos [50], una infección a edad más temprana o al fenómeno de inmunidad pasiva [89].

I.7. Diagnóstico de infección viable mediante detección de antígeno en NCC humana y cisticercosis porcina

La detección de antígeno en NCC humana y cisticercosis porcina permite discriminar la presencia de infección viable y además los niveles de antígeno se relacionan con la carga parasitaria y pueden brindar información sobre la severidad de la infección [69]. De todos los ensayos de detección de antígeno previamente desarrollados, los formatos de ELISA de captura de antígeno (Ag-ELISA) basados en el desarrollo de anticuerpos monoclonales contra antígenos excretorios/secretorios del cisticerco de *T. saginata* y su posterior adaptación para el diagnóstico de cisticercosis por *T. solium* presentan niveles aceptables de sensibilidad y especificidad para infección viable, tanto en NCC humana [85, 95] como en cisticercosis porcina [96]. Uno de estos ensayos, el Ag-ELISA “sándwich” B158/B60 utiliza dos anticuerpos monoclonales, uno de captura (B158C11A10) y

uno de detección (B6084A4) de isotipo IgG que reconocen epítopes antigénicos contenidos en los productos de excreción/secreción del cisticerco de *T. saginata*, pero que posteriormente han sido adaptados para el diagnóstico de cisticercosis por *T. solium* debido a la reacción cruzada específica de género [71].

La capacidad diagnóstica del Ag-ELISA B158/B60 (en términos de sensibilidad y especificidad) no demostró diferencias significativas entre muestras de suero y de líquido cefalorraquídeo de pacientes con NCC, por lo que el monitoreo de antígeno en suero constituye una herramienta no invasiva para diagnóstico de viabilidad en NCC [95]. En sueros de pacientes con NCC el Ag-ELISA B158/B60 reportó 86% y 87% de sensibilidad y especificidad para discriminar infección viable en casos con NCC viable y calcificada, respectivamente [85, 95]. No obstante, la sensibilidad del Ag-ELISA es bastante menor en casos con infecciones viables leves. En entornos clínicos, la detección de anticuerpos es preferida sobre la detección de antígenos como herramienta serológica por su mayor sensibilidad (~100%). Sin embargo, los ensayos de detección de antígenos en suero tienen mayor utilidad para determinar la necesidad de tratamiento antiparasitario y el posterior monitoreo de pacientes con NCC viable, ya que los niveles de antígeno caen rápidamente luego del tratamiento antiparasitario, por lo que el uso de la detección de antígeno en suero mediante Ag-ELISA puede brindar información sobre la eficacia del tratamiento [72]

Por otro lado, la detección de antígeno en cisticercosis porcina preferentemente se utiliza en el monitoreo de infección en cerdos en condiciones experimentales, para

correlacionar los niveles de antígeno con la carga parasitaria y para evaluar la eficacia del tratamiento cisticida mediante medición de la caída de antígeno post-tratamiento [97, 98]. Su uso como herramienta diagnóstica también ha sido evaluado en diferentes estudios de campo en cerdos naturalmente infectados. Sin embargo, el principal problema de los ensayos de Ag-ELISA, como por ejemplo el ensayo basado en los anticuerpos monoclonales B158/B60 en cerdos naturalmente infectados es su baja especificidad (67-76%), la cual se ve seriamente reducida por la reacción cruzada con el cisticerco de *Taenia hydatigena* (*Cysticercus tenuicollis*), cestodo común del cerdo y co-endémico junto con *T. solium*, incrementando en el número de falsos positivos [75, 96]. Por ello no se recomienda esta prueba como herramienta serológica única para el diagnóstico de viabilidad en cisticercosis porcina por *T. solium* en zonas donde la cisticercosis por *T. hydatigena* es co-endémica [75].

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico de infección viable en NCC humana es crucial para un abordaje terapéutico efectivo [60]. Estudios previos en pacientes con NCC que presentaban infecciones viables parenquimales viable han demostrado la eficacia del tratamiento antiparasitario con albendazol y praziquantel que daña el parásito y permite su posterior reconocimiento y destrucción por el sistema inmune del hospedador [60, 61]. El tratamiento reduce también la formación de calcificaciones residuales [99], potenciales focos epileptogénicos [100]. Esto redundando en una reducción de crisis epilépticas y mejora en la progresión de la enfermedad [60, 61, 101]. No obstante, existen desafíos en los métodos diagnósticos actuales para determinar viabilidad en NCC humana.

Las neuroimágenes permiten una identificación más precisa del parásito, su estado y viabilidad en el SNC, aunque los hallazgos no siempre son concluyentes. Por ello, en los algoritmos de diagnóstico las neuroimágenes son complementadas con el EITB, Ag-ELISA u otra prueba equivalente. El EITB es considerado el ensayo serológico de referencia en NCC, aunque la presencia de 1 o más bandas de EITB no discrimina adecuadamente la presencia de infecciones viables. Los patrones de bandas de EITB son más informativos ya que no solo indican la intensidad de respuestas según número de bandas, sino que además reflejan el perfil de la respuesta inmune contra los antígenos del cisticerco con diferencias en estructura y función, siendo algunos más predictores de infección viable, aunque esta asociación no es del todo perfecta. Por ello, la adición de resultados de Ag-ELISA según los

patrones de respuestas de EITB puede mejorar la capacidad de predecir o descartar infección viable en NCC humana, lo que permite identificar a aquellos pacientes que requieran el tratamiento antiparasitario oportuno.

Por otro lado, la detección de cerdos con cisticercosis viable es crítica para la prevención de la transmisión de *T. solium* en la comunidad, ya que la infección en la población porcina refleja el nivel de contaminación con *T. solium* y el reservorio de futuras tenias para el humano, además de que el muestreo en cerdos es más aceptado por la comunidad que el muestreo de teniasis en humanos en los programas de control. Además, se ha identificado la asociación espacial entre la presencia de focos de cisticercosis porcina viable y la presencia de un portador teniásico cercano [76, 102]. Esto permite intervenciones focalizadas alrededor de cerdos infectados (‘estrategia de anillos’) no sólo para el tratamiento de los cerdos con oxfendazol u otros antiparasitarios, sino también para la detección de portadores de tenias en las zonas aledañas, reduciendo así el riesgo de infección con NCC en la población [51]. El diagnóstico de cerdos infectados y su tratamiento eficaz con oxfendazol además evita la pérdida del valor comercial de la carne para el productor y previene un problema económico [11].

El diagnóstico de cisticercosis porcina viable en campo es limitado porque el examen de lengua sólo identifica a los cerdos con altas cargas parasitarias y es poco sensible en cerdos con infecciones leves o moderadas. Por otro lado, la necropsia y examen post-mortem de carcasas es difícil de implementar en intervenciones en campo como parte de los programas de control. Pruebas serológicas como el EITB

y Ag-ELISA tienen alta sensibilidad para el diagnóstico de cisticercosis porcina viable, pero la especificidad de ambas pruebas no es la ideal. La alta prevalencia de anticuerpos en cerdos naturalmente infectados por exposiciones reiteradas en campo, infecciones resueltas o debido a la persistencia de la inmunidad materna transferida pasivamente [89, 103] pueden limitar la especificidad de la detección de número de bandas del EITB para discriminar infección viable. Asimismo, el Ag-ELISA presenta reacciones cruzadas en cerdos infectados con cisticercosis por *T. hydatigena*, otro parásito común del cerdo. El uso de los patrones de bandas de EITB, en lugar de la positividad a número de bandas de EITB podría brindar una mejor información sobre el estado de infección con cisticercosis viable en los cerdos, aunque esto no ha sido evaluado en detalle. Por ello, es importante evaluar si los resultados de EITB (patrones de bandas) y de Ag-ELISA a partir de muestras de suero pueden ser utilizados conjuntamente para discriminar adecuadamente cerdos con cisticercosis viable de forma adecuada, superando así los problemas de la baja especificidad del diagnóstico de número de bandas del EITB para infección viable y la reacción cruzada del Ag-ELISA con cisticercosis por *T. hydatigena*.

A partir de ello, la presente tesis doctoral plantea estudiar la siguiente hipótesis general:

“El uso combinado de los patrones de bandas de EITB más los resultados del Ag-ELISA permiten discriminar apropiadamente infecciones con cisticercos viables y no viables”.

Específicamente, en cada uno de los dos estudios de la tesis, se plantea evaluar las siguientes hipótesis de estudio:

Estudio 1, diagnóstico de NCC humana viable: La combinación de los patrones de bandas de EITB y los resultados de Ag-ELISA mejoran la capacidad de discriminar infección viable y no viable en pacientes con NCC parenquimal determinada mediante neuroimágenes.

Estudio 2, diagnóstico de cisticercosis porcina viable: La combinación de los patrones de bandas de EITB y los resultados de Ag-ELISA mejoran la capacidad de discriminar la presencia de cisticercosis viable en cerdos naturalmente infectados y evaluados mediante examen de necropsia.

La disponibilidad de pruebas serológicas de mayor precisión diagnóstica permitiría, en el largo plazo, implementar mejores acciones en el terreno clínico, de salud pública, investigación y de prácticas agropecuarias.

CAPÍTULO III

CONTRIBUCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de tesis representa una gran contribución en el campo del diagnóstico de NCC humana y cisticercosis porcina para su implementación en futuros estudios o en programas de control. El tesista contribuyó en la concepción de la hipótesis general de la investigación y las hipótesis derivadas para los estudios 1 y 2. Además, el tesista identificó las poblaciones para los estudios 1 y 2 en las cuales los hallazgos de nuestros resultados pueden ser apropiados para el diagnóstico de cisticercosis viable. Por otro lado, el autor también contribuyó en la metodología para el análisis de clases latentes utilizando los patrones de bandas de EITB. El análisis de clases latentes es una herramienta de análisis estadístico ampliamente utilizado en psicología con la finalidad de clasificar personas en subgrupos o clases (“latentes”) mediante análisis de indicadores dicotómicos (generalmente resultados de encuestas o cuestionarios). No obstante, su uso como una herramienta de análisis en diagnóstico serológico de cisticercosis y NCC no había sido realizado antes hasta la publicación de un primer trabajo de investigación por el tesista durante el primer año de estudios de doctorado, demostrando así la asociación entre los patrones de bandas de EITB (clases) con las características de las neuroimágenes en pacientes con NCC y la posterior formulación de la hipótesis de que la combinación de los patrones de bandas de EITB (agrupados en clases según su perfil de respuesta) con los resultados de Ag-ELISA pueden ayudar a discriminar apropiadamente infección viable, tanto en NCC humana como en cisticercosis porcina. La interpretación de los resultados de EITB como patrones de bandas mejora la comprensión sobre el desarrollo de inmunidad durante la infección

con el cisticerco de *T. solium* en el hospedador intermediario en función del perfil de respuesta inmune contra 3 familias antigénicas (GP50, T24/42 y 8-kDa) comparado a la interpretación convencional de resultados de EITB como positivo o negativo a número de bandas. Los análisis de las muestras de suero mediante los ensayos de EITB y Ag-ELISA en ambos estudios también fueron realizados por el tesista en el Laboratorio Diagnóstico de la Unidad de Cisticercosis – INCN y el Laboratorio de Inmunología Parasitaria – UPOCH con el apoyo de personal técnico. Finalmente, los resultados obtenidos en la presente investigación proporcionan una nueva forma de entender la respuesta inmunológica en NCC humana y cisticercosis porcina reflejada en los patrones de bandas de EITB y como en combinación con los resultados de Ag-ELISA pueden tener un uso potencial para identificar o descartar infección viable apropiadamente.

CAPÍTULO IV

INVESTIGACIÓN I: Uso combinado de los patrones de bandas del ensayo de Electro Inmunotransferencia Blot (EITB) y el ensayo de ELISA de captura de antígeno para el diagnóstico de infección viable en neurocisticercosis parenquimal humana

Gianfranco Arroyo^{1,2†}, Javier A. Bustos^{1,2}, Andrés G. Lescano¹, Isidro Gonzales², Herbert Saavedra², E. Javier Pretell³, Yesenia Castillo¹, Pierre Dorny⁴, Erika Pérez², Sukwan Handali⁵, John Noh⁵, Robert H. Gilman⁶, Seth O’Neal⁷, Armando E. Gonzalez⁸ y Héctor H. García^{1,2}, Grupo de Trabajo en Cisticercosis en el Perú[^].

¹Facultad de Salud Pública y Administración (GA, AGL), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias y Filosofía (JAB, YC, HHG) y Centro de Salud Global (GA, JAB, HHG), Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú; ²Unidad de Cisticercosis, Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, Lima, Perú; ³Departamento de Neurología, Hospital Nacional Alberto Sabogal, Callao, Perú; ⁴Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium; ⁵Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, USA; ⁶Department of International Health, Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA; ⁷School of Public Health, Oregon Health & Science University-Portland State University, Portland, Oregon, USA; ⁸Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

^Otros miembros del Grupo de Trabajo en Cisticercosis en el Perú incluyen a Victor C. W. Tsang, PhD; Manuela Verástegui, PhD y Mirko Zimic, PhD (Coordinación General); Sofía, Sánchez, MD y Manuel Martinez, MD (Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, Lima, Perú); Holger Mayta, PhD; Mónica Pajuelo, PhD y Miguel A. Orrego, MSc (Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú); Luis Gómez, MV, MSc; Ana Vargas, MV, MSc; Teresa López, MV, PhD; Eloy Gonzales-Gustavson, MV, MSc, PhD (Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú); Luz M. Moyano, MD, PhD; Ricardo Gamboa, MSc; Percy Vílchez, MSc; Claudio Muro (Grupo de Eliminación de Cisticercosis, Tumbes, Perú); Theodore E. Nash (National Institute of Allergy, and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos de América) y John Friedland, PhD (Imperial College, Londres, Reino Unido).

Título corto. Uso de EITB y Ag-ELISA en NCC viable.

Palabras clave. Neurocisticercosis, EITB, ELISA, anticuerpos, antígenos

Agradecimientos. Un agradecimiento especial al personal de la Unidad de Cisticercosis, Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, Lima, Perú (Erika Pérez y Karen Arteaga) por el procesamiento de muestras mediante EITB y al personal del Laboratorio de Inmunología Parasitaria, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano

Heredia, Lima, Perú (Cindy Espinoza, Tatiana Razuri y Catherine Apaza) para el procesamiento de muestras mediante ELISA.

Financiamiento. Gianfranco Arroyo es estudiante del programa de Doctorado en Ciencias en Investigación Epidemiológicas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia financiado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (FONDECYT/CIENCIA ACTIVA, número de beca: EF033-235-2015). Este estudio recibió además financiamiento parcial por el Centro Fogarty de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos de América (números de becas D43TW001140 y D43TW007393).

Citación: Arroyo et al., 2022

DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.01550-21>

IV.1. Resumen

El diagnóstico de infección viable en NCC humana depende las neuroimágenes y la confirmación serológica. La positividad a 1 o más bandas de anticuerpos en el ensayo de Electro Inmunotransferencia Blot (EITB) indica exposición, aunque falla en identificar infección viable. No obstante, los patrones de bandas de EITB podrían adicionalmente proporcionar información sobre el curso de infección viable en el huésped. La combinación de los patrones de bandas de EITB con los resultados de Ag-ELISA puede mejorar la capacidad de predecir o descartar NCC viable adecuadamente. Evaluamos si la combinación de los patrones de bandas de EITB con los resultados de Ag-ELISA mejora la discriminación de infección viable en pacientes con NCC parenquimal confirmada por neuroimágenes (n = 214). Los patrones de bandas de EITB fueron agrupados en clases mediante análisis de clases latentes. Evaluamos la capacidad combinada de los patrones de bandas de EITB y los resultados de Ag-ELISA) para discriminar infección viable mediante comparación de resultados de Ag-ELISA (verdaderos positivos y falsos negativos con respecto a NCC viable) en cada clase utilizando la prueba exacta de Fisher. Se identificaron cuatro clases: 1 (EITB-negativo o únicamente positivo a GP50 [familia antigénica GP50]), 2 (positivo a GP42-39 y GP24 [familia antigénica T24/42] con o sin GP50, pero negativos a antígenos de 8-kDa); 3 y 4 (positivos a GP50, GP42-39 y GP24 y reaccionando además a las bandas de 8-kDa). La mayoría de los casos en las clases 3 y 4 tuvieron NCC viable (82% y 88%) en comparación a las clases 2 y 1 (53% y 5%). La combinación de los patrones de bandas de EITB con los resultados de Ag-ELISA permitió identificar grupos de casos con o sin NCC viable con una alta probabilidad, principalmente en la clase 2 de EITB (100% de

pacientes Ag-ELISA positivos tuvieron NCC viable, mientras que 27.5% de pacientes Ag-ELISA negativos tuvieron NCC viable, $P = 0.001$), en menor medida en las clases 3 y 1, mientras que en la clase 4, no mejoró el diagnóstico de infección viable. El uso combinado de los patrones de bandas de EITB (particularmente la clase 2) y resultados de Ag-ELISA permiten discriminar infección viable complementando así a las neuroimágenes para el diagnóstico más preciso de viabilidad en NCC humana, y además podrían servir para priorizar el tamizaje imagenológico de NCC viable en zonas de difícil acceso a neuroimágenes.

IV.2. Introducción

La neurocisticercosis (NCC) es la parasitosis más común del sistema nervioso central (SNC) humano y es ocasionada por el estadio larvario (cisticerco) del cestodo zoonótico *Taenia solium* [1, 3]. La NCC es considerada la principal causa de epilepsia secundaria en el mundo y es endémica en zonas rurales de escasos recursos económicos caracterizadas por la falta de saneamiento y la crianza no tecnificada de cerdos [1, 11]. Asimismo, la NCC es una enfermedad emergente en países subdesarrollados debido a la migración de casos provenientes de zonas endémicas [24, 104]. La NCC está en la lista principal de enfermedades desatendidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y ocasiona un impacto negativo en la salud pública debido al carácter crónico de la enfermedad y la carga económica asociada a los costos en tratamientos y pérdida de productividad en los pacientes afectados [105, 106].

La diversidad de manifestaciones clínicas en pacientes con NCC depende de las características de la infección en el SNC (localización, fase de desarrollo y carga parasitaria) y de la respuesta inmune del hospedador [52, 107]. La epilepsia es la manifestación clínica más común y está relacionada con la infección del parénquima cerebral [10, 16]. Los pacientes con NCC parenquimal viable permanecen asintomáticos por un período de tiempo prolongado, luego del cual el cisticerco es reconocido por el sistema inmune, desencadenándose la respuesta inflamatoria que conlleva a la degeneración del parásito y eventualmente a la formación de calcificaciones residuales, potenciales focos epileptogénicos [100, 108]. El tratamiento antiparasitario acelera la degeneración, muerte y resolución del

parásito, lo que a su vez favorece en la evolución clínica favorable en los pacientes [60, 61, 101]. No obstante, el tratamiento antiparasitario depende del diagnóstico preciso de la presencia de cisticercos viables en el cerebro.

Las neuroimágenes son la principal herramienta para el diagnóstico de NCC ya que permiten el reconocimiento del parásito en el SNC, su localización, fase de desarrollo y carga parasitaria. La resonancia magnética (RM) es altamente sensible para detectar cisticercos cerebrales viables (~100%), aunque su sensibilidad para detectar lesiones no viables (calcificaciones residuales) es menor [109, 110]. Por otro lado, la tomografía computarizada (TC) es superior (más sensible) para el diagnóstico de calcificaciones residuales [111, 112]. No obstante, los hallazgos de neuroimágenes no son siempre definitivos y en algunos casos pueden fallar en detectar lesiones cerebrales y tampoco están extensamente disponibles en áreas hiperendémicas. Por ello, los ensayos de serología pueden ayudar a confirmar o refutar el diagnóstico de NCC viable, particularmente cuando las neuroimágenes no son concluyentes o no están disponibles.

El ensayo de Electro Inmunotransferencia Blot (EITB) detecta bandas de anticuerpos contra siete glicoproteínas del cisticerco de *T. solium* (GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13) obtenidas mediante purificación en lentil-lectina. El EITB es considerado el ensayo serológico de referencia para detección de anticuerpos en NCC [69] y estudios iniciales considerando la positividad a 1 o más bandas de EITB reportaron niveles altos de sensibilidad y especificidad (98% y 100%) en pacientes con NCC viable múltiple [66, 67], aunque su sensibilidad es

menor en infecciones viables únicas [67]. Estudios posteriores reportaron discordancia entre la positividad a una o más bandas de EITB y los hallazgos de neuroimágenes para viabilidad en pacientes con NCC. La detección de anticuerpos en el EITB tiene el propósito de demostrar exposición a *T. solium*, pero no necesariamente indica infección viable, ya que los anticuerpos pueden estar presentes también en infecciones no viables y persistir luego de la resolución del cisticerco [84]. Debido a ello, la categorización de los resultados de EITB como positivo o negativo a número de bandas [85] no predice adecuadamente infección viable en NCC humana. No obstante, los resultados de EITB analizados como patrones de bandas (es decir, la concatenación de resultados dicotómicos de cada una de las bandas de EITB) no ocurren al azar y su distribución refleja mejor el perfil de respuesta inmune contra los antígenos del cisticerco de *T. solium*, los cuales pertenecen a tres familias antigénicas distintivas, cada una con estructura y función biológica diferenciada. La familia GP50 incluye proteínas glicosiladas de tipo transmembrana con glicosil-fosfatidil-inositol que migran en la posición de 50-kDa del EITB [91]. La familia de antígenos T24/42 incluye proteínas de tipo tetraspaninas (proteínas transmembrana involucrada en procesos de proliferación, adhesión, motilidad y andamiaje para complejos proteicos) que migran en la posición de 42-39kDa y en homodímeros en la posición de 24-kDa del EITB [92]. Por último, la familia de antígenos de 8-kDa incluye proteínas pequeñas que se encuentran en las posiciones de 21, 18, 14 y 13-kDa del EITB y se caracterizan como productos excretorios/secretorios del parásito con probable actividad evasora de la respuesta inmune [90]. Los patrones de bandas de EITB pueden proporcionar información valiosa para discriminar infección viable en NCC ya que algunos

patrones de bandas de EITB (aquellas respuestas contra antígenos de 8-kDa) se asocian mejor con infecciones viables [94], aunque otros patrones de bandas EITB (respuestas contra antígenos GP50 o T24/42) no son tan informativo sobre la presencia de viabilidad, o principalmente indican infecciones no viables.

La detección de antígeno en suero puede proporcionar información sobre la presencia de cisticercos viables y además proporciona información sobre la carga parasitaria y severidad de la infección en NCC [69]. El desarrollo de ensayos de inmunoabsorbancia ligada a enzima (ELISA) basados en el uso de anticuerpos monoclonales mejoró notablemente la especificidad de la detección de antígeno para el diagnóstico de viabilidad en NCC [70, 71, 95]. Asimismo, la sensibilidad de los formatos actuales de Ag-ELISA es aceptable (80-90%) en infecciones cerebrales viables múltiples, aunque se reduce significativamente en presencia de infecciones viables únicas (50-60%), por lo que se prefiere la detección de anticuerpos como herramienta serológica complementaria [85, 95]. A pesar de ello, la combinación de los resultados de Ag-ELISA con la información proporcionada por los patrones de bandas de EITB podría mejorar la capacidad de discriminar infección viable en NCC y ambos resultados podrían complementar más apropiadamente a las neuroimágenes para definir con mejor precisión diagnóstica el estatus de infección viable en NCC. Por lo tanto, el presente estudio evaluó el uso combinado de los patrones de bandas de EITB y Ag-ELISA para el diagnóstico de NCC parenquimal viable.

IV.3. Materiales y métodos

IV.3.1. Diseño de estudio y participantes

El presente estudio es un análisis de tipo transversal de evaluación diagnóstica e incluyó a todos los pacientes sintomáticos que acudieron a la Unidad de Cisticercosis del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN) de Lima para diagnóstico inicial de NCC por presentar síntomas compatibles con NCC como convulsiones, dolor de cabeza crónico, entre otros durante el período 2015-2019. Los pacientes fueron inicialmente elegibles si tuvieron una RM y TAC tomadas en un período de tiempo no mayor de 3 meses antes o después de su primera muestra de suero con la finalidad de evitar un efecto de sesgo en la evolución de la enfermedad entre los hallazgos de neuroimágenes y la serología. Los pacientes fueron posteriormente incluidos en el estudio si sus neuroimágenes presentaron lesiones compatibles con NCC parenquimal luego de la revisión por radiólogos del estudio. Estas lesiones podían ser cisticercos viables (lesiones redondeadas pequeñas de aproximadamente 10 milímetros de diámetro, llenas de contenido en su interior de señal hiperintensa en secuencias T2 de RM, con o sin edema periquístico y en algunos casos con un nódulo interno correspondiente al escólex invaginado, Figura 2A) o calcificaciones residuales (lesiones nodulares pequeñas con señal hiperdensa en la TAC, con o sin edema perilesional, Figura 2B). Se excluyeron a aquellos pacientes cuyas neuroimágenes fueron consideradas negativas durante la revisión y a aquellos que presentaron únicamente cisticercos en fase degenerativa (lesiones nodulares con ausencia de señal de contenido líquido en la RM y marcada reacción inflamatoria periquística), ya que estas lesiones no son consideradas viables y frecuentemente son negativas en el Ag-ELISA por lo

que son inapropiadas para evaluar el uso de la detección de antígeno en NCC viable. Se excluyeron también pacientes con lesiones compatibles con NCC extraparenquimal (cisticercos subaracnoideos y/o ventriculares) debido a que su respuesta serológica de EITB y Ag-ELISA es extremadamente fuerte.

IV.3.2. Procedimientos de estudio

IV.3.2.1. Neuroimágenes

Las lecturas de neuroimágenes de los pacientes (RM y TAC) fueron realizadas por un radiólogo independiente y los hallazgos fueron posteriormente confirmados por neurólogos del grupo de investigación. A partir de las lecturas de neuroimágenes los casos fueron clasificados como con NCC viable (al menos un cisticerco viable, independientemente de la presencia o ausencia de calcificaciones) o con NCC calcificada (presencia de lesiones calcificadas únicamente) y considerados como estándar diagnóstico para comparar la capacidad de discriminar infección viable de los ensayos de EITB (patrones de bandas) y Ag-ELISA. La carga de cisticercos viables (carga parasitaria) en los casos con NCC viable también fue registrada y clasificada en 1 o 2 cisticercos y 3 o más cisticercos viables.

IV.3.2.2. Electro Inmunotransferencia Blot (EITB)

Se realizó el ensayo de EITB de detección de anticuerpos contra glicoproteínas específicas del cisticerco de *T. solium* según la metodología previamente descrita por Tsang et al en las muestras de suero de los pacientes [66]. Las lecturas de bandas de EITB fueron realizadas por un técnico de laboratorio y posteriormente confirmadas por el supervisor de laboratorio. Las lecturas de bandas fueron

realizadas en ciego con respecto a los hallazgos de neuroimágenes y muestras con resultados dudosos fueron reprocesadas. Los resultados de EITB fueron reportados como número de bandas (0 a 7). Adicionalmente, se reportó la presencia o ausencia de cada una de las bandas de EITB.

IV.3.2.3. ELISA de captura de antígeno (Ag-ELISA)

Las muestras de suero de los pacientes también fueron procesadas mediante el ensayo de Ag-ELISA de captura de antígeno utilizando los anticuerpos monoclonales B158/B60 inicialmente descritos por Brandt et al [71] y posteriormente utilizados en estudios de NCC humana [85, 95]. Brevemente, las placas de ELISA fueron sensibilizadas con los anticuerpos monoclonales de captura B158C11A10 y luego de pasos de lavado de placas e incubación con las muestras de suero humano (100 μ L) se adicionó el anticuerpo de detección B60H8A4-BIOT para la reacción enzimática mediante estreptavidina peroxidasa y el cromógeno. Los valores de densidad óptica (DO) de cada muestra problema en las placas de ELISA fueron obtenidos mediante lectura en un espectrofotómetro (492/650 nm de longitud de onda). Estos valores fueron divididos por los valores de DO de un grupo de 8 sueros de personas confirmados como negativos (sin NCC) para el cálculo del ratio antigénico. Se definió arbitrariamente como criterio de positividad antigénica en el ensayo de Ag-ELISA si los valores de ratio antigénicos fueron mayores a 1.

IV.3.3. Análisis estadístico

Los hallazgos de neuroimágenes (diagnóstico de NCC viable o NCC calcificada, número de cisticercos cerebrales viables y calcificaciones según RM y TAC),

resultados de EITB, Ag-ELISA e información demográfica de los pacientes fueron resumidos mediante estadísticos descriptivos. Se realizó un análisis de clases latentes utilizando los resultados dicotómicos (presencia o ausencia) de cada banda de EITB para agrupar los patrones (combinaciones) de bandas en un número pequeño de clases homogéneas seleccionadas según su similitud y correlación con métodos de estimación de máxima verosimilitud. Se ejecutaron modelos con 2 a 6 clases para determinar el modelo más parsimonioso, es decir aquel que maximice la varianza explicada de las siete bandas de EITB con menor número de clases. Se definió el número óptimo de clases del modelo utilizando los criterios de información de Akaike y de Bayes los cuales definen el modelo más adecuado según penalización por los valores de verosimilitud y ajuste por el tamaño muestral [109] y ajuste por el tamaño muestral. Asimismo, se planteó como criterio de selección del número de clases en el modelo a la posible interpretación de cada clase según la identificación de sus patrones de bandas. La estructura de cada clase fue caracterizada por su prevalencia y las probabilidades de cada banda condicional a las clases. Posteriormente se realizaron análisis bivariados entre las clases (patrones de bandas de EITB) y las características de los pacientes (edad, sexo, hallazgos de imágenes, resultados de Ag-ELISA, ratio antigénico). Posteriormente evaluamos la contribución de los resultados de Ag-ELISA sobre los patrones de bandas de EITB (clases) para predecir o descartar NCC viable (estándar diagnóstico definido mediante las neuroimágenes) mediante comparación de los resultados verdaderos positivos y falsos negativos de Ag-ELISA en cada clase utilizando la prueba exacta de Fisher. Como objetivo secundario se evaluó además la distribución de cargas parasitaria con NCC viable según las clases (patrones de

bandas de EITB) en pacientes positivos y negativos a Ag-ELISA mediante análisis no paramétrico de tendencias de Cochran-Armitage. Todos los análisis se realizaron en el programa estadístico RStudio v1.2.5001 [113] utilizando el paquete poLCA para el análisis de clases latentes. Se consideró un nivel de significancia estadística de 5%.

IV.3.4. Consideraciones éticas

Todos los procedimientos descritos en el presente estudio han sido previamente revisados y aprobados por los Comités Institucionales de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (número de aprobación 103-656) y del INCN (número de aprobación 592-2019). En el presente estudio se utilizó información anónima de los pacientes que previamente firmaron un consentimiento informado autorizando el uso de la información.

IV.4. Resultados

Durante el período 2015-2019, un total de 936 pacientes sintomáticos acudieron a la Unidad de Cisticercosis del INCN para el diagnóstico primario de NCC, de los cuales 342 pacientes cumplieron con los criterios iniciales de elegibilidad. Posteriormente, se excluyeron 15 pacientes cuyos hallazgos de neuroimágenes no fueron considerados como NCC; se excluyeron además 4 pacientes con cisticercos cerebrales degenerados únicamente y 99 pacientes con lesiones compatibles con NCC extraparenquimal (Figura 4).

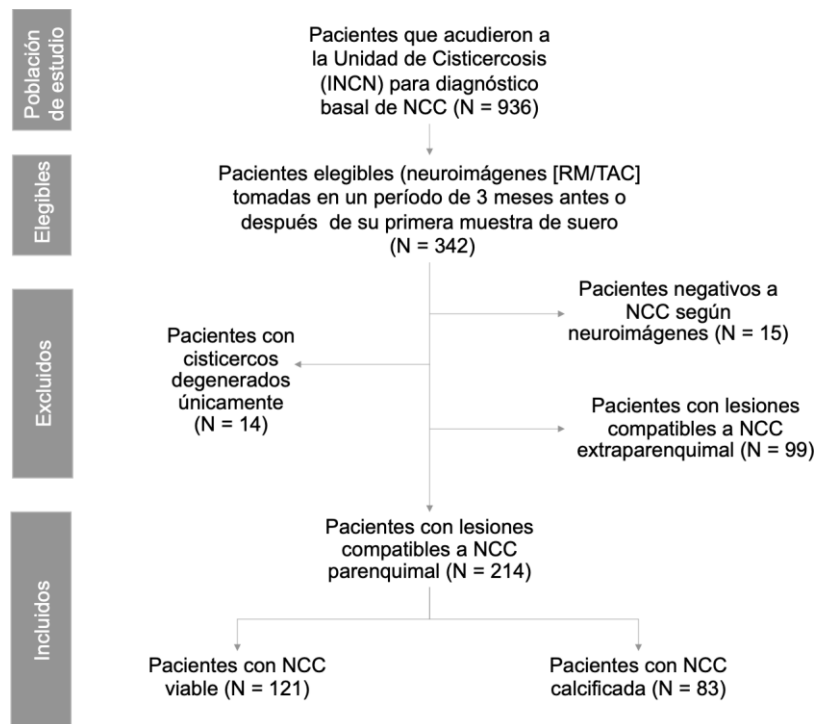


Figura 4. Flujograma de selección de participantes

Las características de los pacientes del estudio son presentadas en la tabla 1. Un total de 214 pacientes con NCC parenquimal fueron incluidos, de los cuales 131 tuvieron infección viable (mediana de cisticercos viables: 2 [rango intercuartílico, RIC: 0-4]) y 83 tuvieron únicamente infecciones calcificadas (mediana de calcificaciones: 2 [RIC: 1-7]). Asimismo, de los 131 pacientes con NCC viable, 72 (55%) tuvieron 1 a 2 cisticercos y 59 (45%) tuvieron 3 o más cisticercos. Los pacientes de estudio tuvieron una edad promedio y desviación estándar de 43.2 ± 14.4 años y 108 (50.5%) fueron mujeres. Un total de 183 pacientes (85.5%) fueron positivos a 1 o más bandas de EITB (mediana de número de bandas: 4 [RIC: 2-7]), de los cuales casi todos tuvieron bandas de anticuerpos contra las glicoproteínas más pesadas (GP50 [93.4%], GP42-39 [94.5%] y GP24 [93.4%]), mientras que una menor proporción de pacientes tuvieron bandas de anticuerpos contra los antígenos más pequeños (GP21 [43.2%], GP18 [42.6%], GP14 [47%] y GP13 [56.8%]). Por otro lado, un total de 126 pacientes (58.9%) fueron positivos a Ag-ELISA (mediana de ratio antigénico: 2.2 [RIC: 0.6-20.9]).

Tabla 1. Características de los participantes de estudio (N = 214)

Características	n (%)
Edad (años) [†]	43 ± 14.4
Sexo	
Femenino	108 (50.5)
Masculino	106 (49.5)
EITB	
Positivo	183 (85.5)
Frecuencia de cada banda	
GP50	171 (93.4)
GP42-39	174 (95.1)
GP24	171 (93.4)
GP21	79 (43.2)
GP18	78 (42.6)
GP14	86 (46.9)
GP13	104 (56.8)
Nº de bandas [‡]	4 (2-7)
0	31 (14.5)
1	9 (4.2)
2	15 (7.0)
3	47 (22.0)
4	20 (9.4)
5	15 (7.0)
6	11 (5.1)
7	66 (30.8)
Ag-ELISA	
Positivo	126 (58.9)
Ratio antigénico [‡]	2.2 (0.6-20.9)
Hallazgos de neuroimágenes	
NCC viable	131 (61.2)
NCC calcificada	83 (38.8)
Nº de cisticercos viables [‡]	2 (0-4)
Nº de calcificaciones [‡]	2 (1-7)

[†]Media ± desviación estándar; [‡]mediana (rango intercuartílico)

Se identificaron solo 16 combinaciones o patrones de las siete bandas de EITB entre los 214 pacientes de estudio e incluidos en el análisis de clases latentes. Los criterios de información de Akaike y Bayes identificaron los modelos con cuatro y tres clases respectivamente como modelos óptimos con la mejor bondad de ajuste según la correlación entre los patrones de bandas (Tabla 2). Se eligió el modelo de cuatro clases debido a que cada clase agrupó patrones de bandas de EITB que representaron mejor la respuesta de anticuerpos contra familias antigénicas del cisticerco de *T. solium* (GP50, T24/42 y 8kDa, Figura 5), lo que no se observó en el modelo de tres clases (ver distribución del modelo de 3 clases para patrones de bandas de EITB en pacientes con NCC en el Anexo 1).

Tabla 2. Estadísticos de bondad de ajuste para determinar el número óptimo de clases para los patrones de bandas de EITB en el análisis de clases latentes

Criterio de información	2 clases	3 clases	4 clases	5 clases	6 clases
Akaike	1170.89	991.11	972.13*	984.81	999.65
Bayes	1221.38	1068.53*	1076.47	1116.08	1157.85

*Número óptimo de clases según el criterio de información

Brevemente, la clase 1 agrupó a 40 participantes que presentaron 0 a 1 bandas reactivas e incluyó dos patrones de bandas observados en total; pacientes EITB-negativos o positivos únicamente a la banda GP50, relacionado a la familia antigénica del mismo nombre (Tabla 3). La clase 2 (62 participantes, 2 a 3 bandas reactivas, 4 patrones) incluyó a pacientes positivos a las bandas GP42-39 y/o GP24 (relacionadas a la familia antigénica T24/42), sin respuesta positiva a la familia antigénica de 8-kDa e independiente de la respuesta contra GP50. La clase 3 (39 participantes, 4 a 6 bandas reactivas, siete patrones) incluyó pacientes positivos a las bandas GP50, GP42-39 y GP24 (familias GP50 y T24/42) y además positivos a las bandas de 8-kDa GP14 y/o GP13, pero negativos a GP21, GP18 o a ambas. Por último, la clase 4 (73 participantes, 5 a 7 bandas reactivas, cuatro patrones), también incluyó pacientes positivos también a las bandas GP50, GP42-39 y GP24 (familias GP50 y T24/42) como la clase 3, pero todos los pacientes fueron positivos a GP21 y a GP18. La probabilidad estimada de cada banda de EITB dentro de cada clase y la frecuencia de las clases son presentadas en la Tabla 4.



Figura 5. Distribución de patrones de bandas de EITB en el modelo de 4 clases. Clase 1 (EITB-negativo o positivo únicamente a antígenos de la familia GP50, 0-1 bandas reactivas, 2 patrones); Clase 2 (positivo a antígenos de la familia antigénica T24/42, con reacción a GP50, pero negativos a antígenos de 8 kDa, 2-3 bandas reactivas, 4 patrones); Clase 3 (positivo a antígenos de las familias antigénicas GP50 y T24/42 y además positivo a antígenos de la familia antigénica de 8 kDa [negativo a bandas GP21, GP18 o ambas, 4-6 bandas reactivas, 7 patrones]; Clase 4 (positivo a antígenos de las familias GP50 y T24/42 y además fuertemente positivos a antígenos de 8-kDa [incluye respuestas positivas a GP21 y GP18], 5-7 bandas reactivas, 4 patrones)

Tabla 3. Descripción de clases* y distribución de patrones de bandas de EITB en cada clase

Descripción de clases	N	Nº de bandas reactivas	Patrones de bandas [†]	n (%)
<u>Clase 1</u>				
EITB-negativo o únicamente positivo a antígenos de la familia GP50	40	0	0000000	31 (77.5)
		1	1000000	9 (22.5)
<u>Clase 2</u>				
Positivo a antígenos de la familia T24/42, con o sin reacción a antígenos de la familia GP50, pero negativos a antígenos de 8 kDa	62	2	0110000	12 (19.4)
		2	1010000	1 (1.6)
		3	1100000	3 (4.8)
			1110000	46 (74.2)
<u>Clase 3</u>				
Positivo a antígenos de las familias GP50 y T24/42 y positivo a antígenos de la familia de 8 kDa (negativo a las bandas GP21, GP18 o ambas)	39	4	1110001	16 (41.0)
		4	1110010	4 (10.3)
		5	1110011	8 (20.5)
		5	1110101	3 (7.7)
		6	1110111	2 (5.1)
		5	1111001	3 (7.7)
	6	1111011	3 (7.7)	
<u>Clase 4</u>				
Positivo a antígenos de las familias GP50 y T24/42 y positivos a antígenos de la familia de 8 kDa (incluye respuestas positivas contra GP21 y GP18)	73	5	1111100	1 (1.4)
		6	1111101	3 (4.1)
		6	1111110	3 (4.1)
		7	1111111	66 (90.4)

*Las clases fueron definidas mediante el criterio estadístico de Akaike

[†]Valores 1 y 0 indican la presencia o ausencia de cada una de las bandas de EITB (GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14 and GP13).

Tabla 4. Probabilidades condicionales de pertenencia a clases para cada banda y prevalencias de clases obtenidas del modelo de 4 clases en el análisis de clases latentes

Bandas de EITB	Clases[†]			
	1	2	3	4
GP50	22.4	81.8	100.0	100.0
GP42-39	0.0	98.4	100.0	100.0
GP24	0.0	95.4	100.0	100.0
GP21	0.0	0.0	15.4	99.4
GP18	0.0	0.0	15.6	97.9
GP14	0.0	0.0	33.9	95.0
GP13	0.0	0.0	100.0	94.6
<u>Prevalencia de cada clase (%)</u>	18.7	30.8	16.4	34.1

[†]Clases: 1 (EITB-negativo o positivo únicamente a antígenos de la familia GP50, 0-1 bandas reactivas, 2 patrones); 2 (positivo a antígenos de la familia antigénica T24/42, con o sin reacción a GP50 pero negativos a antígenos de 8 kDa, 2-3 bandas reactivas, 4 patrones); 3 (positivo a antígenos de las familias antigénicas GP50 y T24/42 y además positivo a antígenos de la familia antigénica de 8 kDa [negativo a las bandas GP21, GP18 o ambas], 4-6 bandas reactivas, 7 patrones); 4 (positivo a antígenos de las familias GP50 y T24/42 y además fuertemente positivos a antígenos de 8 kDa [incluye respuestas contra GP21 y GP18], 5-7 bandas reactivas, 4 patrones).

No se observó una asociación sistemática significativa entre la edad y el sexo con las clases de respuestas de EITB (patrones de bandas) (Tabla 5). En contraste, tanto la proporción de casos con NCC viable como la carga parasitaria y la positividad a antígeno y ratios correspondientes tuvieron una clara y significativa gradiente entre clases, con mayor frecuencia en las clases 3 y 4, y progresivamente menor frecuencia en las clases 2 y 1, respectivamente. La gran mayoría de pacientes en las clases 3 y 4 tuvieron NCC viable (32/39 [82.1%] y 64/73 [87.7%] respectivamente), en comparación a pacientes en la clase 2 (33/62 [53.2%]), mientras que en la clase 1 sólo dos casos tuvieron NCC viable (5.0%). La carga parasitaria con cisticercos cerebrales viables también fue más alta en las clases 3 y 4 (mediana de cisticercos: 3 [RIC: 1-7] y mediana de cisticercos: 3 [RIC: 1-13]) en comparación a la clase 2 (mediana de cisticercos: 2 [rango: 0-2]), mientras que los dos casos con NCC viable en la clase 1 tuvieron solo uno y dos cisticercos viables, respectivamente. El porcentaje de pacientes positivos a Ag-ELISA fue también mucho mayor en las clases 3 y 4 (33/39 [84.6%] y 67/73 [91.8%] respectivamente), y menor en la clase 2 (22/62, 35.5%) y clase 1 (4/40, 10%). Los valores de ratio antigénico también fueron estadísticamente mayores en las clases 3 y 4 y menores en las clases 2 y 1 ($P < 0.001$).

Tabla 5. Características de los pacientes según patrones de bandas de EITB

(clases)

Variables	Clase 1 (N = 40)	Clase 2 (N = 62)	Clase 3 (N = 39)	Clase 4 (N = 73)	P
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Edad (años) [†]	47.2 ± 15.5	43.4 ± 16.8	41.7 ± 12.0	41.8 ± 12.6	0.230**
Sexo					
Femenino	26 (65.0)	33 (53.2)	15 (38.5)	34 (46.6)	0.100***
Masculino	14 (35.0)	29 (46.8)	24 (61.5)	39 (53.4)	
Ag-ELISA					
Positivo	4 (10.0)	22 (35.5)	33 (84.6)	65 (89.0)	<0.001***
Ratio antigénico [‡]	0.6 (0.5–0.7)	0.7 (0.5–2.5)	13.9 (2.5–33.9)	20.9 (3.4–48.8)	<0.001****
Hallazgos de neuroimágenes					
NCC viable	2 (5.0)	33 (53.2)	32 (82.1)	64 (87.7)	<0.001***
NCC calcificada	38 (95.0)	29 (46.8)	7 (17.9)	9 (12.3)	
Número de cisticercos viables [‡]	1.5 (1–2)	2 (0–2)	3 (1–7)	3 (1–13)	<0.001****

*Clases: 1 (EITB-negativo o positivo únicamente a antígenos de la familia GP50, 0-1 bandas reactivas, 2 patrones); 2 (positivo a antígenos de la familia antigénica T24/42, con o sin reacción a GP50 pero negativos a antígenos de 8 kDa, 2-3 bandas reactivas, 4 patrones); 3 (positivo a antígenos de las familias antigénicas GP50 y T24/42 y además positivo a antígenos de la familia antigénica de 8 kDa [negativo a las bandas G21, GP18 o ambas], 4-6 bandas reactivas, 7 patrones); 4 (positivo a antígenos de las familias GP50 y T24/42 y además fuertemente positivos a antígenos de 8 kDa [incluye respuestas positivas contra GP21 y GP18], 5-7 bandas reactivas, 4 patrones)

[†]Media ± desviación estándar

[‡]Mediana (rango intercuartílico)

**Valor P obtenido mediante análisis de varianza de una vía

***Valor P obtenido mediante análisis de Chi cuadrado

****Valor P obtenido mediante análisis de Kruskal Wallis

La clasificación de pacientes con NCC según sus patrones de bandas de EITB identificó que en las clases 3 y 4 más del 80% de los pacientes tenían NCC viable. Asimismo, se observó que en la clase 1 los pacientes mayoritariamente tenían únicamente calcificaciones (95% de los casos), mientras que en la clase 2 se observó NCC viable y NCC calcificada en aproximadamente el 50% de los casos. En los 62 pacientes pertenecientes a la clase 2 de EITB, la adición de los resultados de Ag-ELISA identificó que todos los 22 pacientes con Ag-ELISA positivo tuvieron NCC viable, mientras que sólo 11/40 pacientes (27.5%) negativos a Ag-ELISA en esta clase tuvieron NCC viable ($P < 0.001$). Similarmente, en los 39 pacientes de la clase 3 de EITB, 33 (84.6%) con resultado Ag-ELISA positivo tuvieron 88% de NCC viable (29/33) mientras que entre los seis pacientes Ag-ELISA negativos sólo 50% de ellos tuvieron NCC viable ($P = 0.059$). La adición de un resultado Ag-ELISA positivo en la clase 1 permitió detectar NCC viable en 1 de 4 pacientes (25%), aunque solamente 1 de 36 pacientes (2.8%) negativos a Ag-ELISA en la clase 1 tuvieron NCC viable ($P = 0.192$). Por otro lado, los resultados de Ag-ELISA en la clase 4 no permitieron discriminar adecuadamente grupos de pacientes con o sin NCC viable, ya que la frecuencia de NCC viable en los pacientes Ag-ELISA positivos fue bastante alta (58/67 [86.6%]), aunque todos los 6 pacientes (100%) con resultado Ag-ELISA negativo en esta clase también tuvieron NCC viable ($P = 0.440$).

Tabla 6. Porcentaje de pacientes con NCC viable según resultados de Ag-ELISA y patrones de bandas de EITB

Clases	Total (N=214)	Ag-ELISA positivo (N = 126)	Ag-ELISA negativo (N = 88)	P
Total	131/214 (61.2)	110/126 (87.3)	21/88 (23.9)	<0.001
Clase 1	2/40 (5.0)	1/4 (25.0)	1/36 (2.8)	0.192
Clase 2	33/62 (53.2)	22/22 (100.0)	11/40 (27.5)	<0.001
Clase 3	32/39 (82.1)	29/33 (87.9)	3/6 (50.0)	0.059
Clase 4	64/73 (87.7)	58/67 (86.6)	6/6 (100.0)	0.440

*Clases: 1 (EITB-negativo o positivo únicamente a antígenos de la familia GP50, 0-1 bandas reactivas, 2 patrones); 2 (positivo a antígenos de la familia antigénica T24/42, con o sin reacción a GP50 pero negativo a antígenos de 8 kDa, 2-3 bandas reactivas, 4 patrones); 3 (positivo a antígenos de las familias antigénicas GP50 y T24/42 y además positivo a antígenos de la familia antigénica de 8 kDa [negativo a bandas GP21, GP18 o ambos], 4-6 bandas reactivas, 7 patrones); 4 (positivo a antígenos de las familias GP50 y T24/42 y además fuertemente positivos a antígenos de 8 kDa [incluye respuestas positivas a GP21 y GP18], 5-7 bandas reactivas, 4 patrones).

La carga parasitaria cerebral con cisticercos viables difiere claramente entre pacientes con resultados de Ag-ELISA positivo o negativo dentro de una misma clase (Tabla 7). En la clase 1, hubo un mayor porcentaje de pacientes con cisticercos viables que tenían resultados Ag-ELISA positivo en comparación a los pacientes negativos a Ag-ELISA (1/4 [25%] comparado a 1/36 [2.8%]), aunque la diferencia no fue significativa ($P = 0.192$). Los dos únicos casos con NCC viable en esta clase correspondieron a infecciones con uno y dos cisticercos. Sin embargo, en las clases 2, 3 y 4, un resultado de Ag-ELISA positivo se asoció significativamente a infecciones con más cisticercos viables ($P < 0.001$, $P = 0.026$ y $P = 0.025$, respectivamente). Por otro lado, en los pacientes Ag-ELISA negativos, la proporción de infecciones sin cisticercos viables bajó de 72.5% a 50% y luego a 0% en las clases 2, 3 y 4 de EITB, respectivamente. Pese a observarse casos con NCC viable en pacientes Ag-ELISA negativos de las clases 2, 3 y 4, estas infecciones mayoritariamente tuvieron uno o dos cisticercos.

Tabla 7. Carga parasitaria cerebral con cisticercos viables en pacientes con resultados positivo o negativo a Ag-ELISA según clases* de EITB

Clase	Resultado de Ag-ELISA	N	Número de cisticercos viables			P
			0	1-2	3+	
1	Positivo	4	3 (75.0)	1 (25.0)	0 (0.0)	0.107
	Negativo	36	35 (97.2)	1 (2.8)	0 (0.0)	
2	Positivo	22	0 (0.0)	12 (54.5)	10 (45.5)	<0.001
	Negativo	40	29 (72.5)	11 (27.5)	0 (0.0)	
3	Positivo	33	4 (12.1)	9 (27.3)	20 (60.6)	0.076
	Negativo	6	3 (50.0)	2 (33.3)	1 (16.7)	
4	Positivo	67	9 (13.4)	18 (26.9)	40 (59.7)	0.075
	Negativo	6	0 (0.0)	5 (83.3)	1 (16.7)	

*Clases: 1 (EITB-negativo o positivo únicamente a antígenos de la familia GP50, 0-1 bandas reactivas, 2 patrones); 2 (positivo a antígenos de la familia antigénica T24/42, con o sin reacción a GP50 pero negativo a antígenos de 8 kDa, 2-3 bandas reactivas, 4 patrones); 3 (positivo a antígenos de las familias antigénicas GP50 y T24/42 y además positivo a antígenos de la familia antigénica de 8 kDa [negativo a bandas GP21, GP18 o ambos], 4-6 bandas reactivas, 7 patrones); 4 (positivo a antígenos de las familias GP50 y T24/42 y además fuertemente positivos a antígenos de 8 kDa [incluye respuestas positivas a GP21 y GP18], 5-7 bandas reactivas, 4 patrones)

IV.5. Discusión

El tratamiento antiparasitario en NCC parenquimal viable acelera el proceso de destrucción y resolución del cisticerco en el SNC, lo que a su vez reduce la probabilidad del desarrollo de crisis epilépticas [60, 101]. Las neuroimágenes constituyen la principal herramienta diagnóstica en entornos clínicos para discriminar la presencia de NCC viable que requieren tratamiento antiparasitario. No obstante, el diagnóstico de cisticercos cerebrales viables mediante neuroimágenes no es absoluto, no está fácilmente disponible en muchos hospitales, y requiere ser complementado con la serología [9]. Nuestros resultados demuestran que combinar los resultados de Ag-ELISA y los patrones de bandas de EITB permite identificar diferentes sub-grupos de pacientes con alta probabilidad (más del 80%) de tener NCC viable que requieren tratamiento antiparasitario. Las pruebas serológicas pueden así complementar más apropiadamente a las neuroimágenes para un diagnóstico y tratamiento correcto.

Los patrones de bandas de EITB en pacientes con NCC son muy informativos ya que reflejan la naturaleza de las respuestas de anticuerpos, no solo en número de bandas positivas, sino que además describen el perfil de reacción inmunológica contra las familias de glicoproteínas de *T. solium* (GP50, T24/42 y 8 kDa) [90-92]. Estos patrones de bandas además presentan fuerte correlato con los hallazgos de neuroimágenes, caracterizando mejor el estatus de infección en el paciente [94]. Una investigación previa de nuestro grupo demostró la utilidad del análisis de clases latentes para agrupar patrones de anticuerpos de EITB en grupos similares con respecto a sus respuestas contra las familias antigénicas [94]. En nuestro estudio

pudimos replicar consistentemente la organización de los patrones de bandas de EITB en clases, observándose en la clase 1 las respuestas de anticuerpos negativas o únicamente positivas a GP50 [101], en la clase 2 respuestas de anticuerpos contra antígenos de la familia T24/42 (GP42-39 y/o GP24) [100] y en las clases 3 y 4 respuestas de anticuerpos contra antígenos de 8 kDa de tipo excretorio/secretorio (GP21, GP18, GP14 y GP13) [90]. Si bien las clases 3 y 4 tuvieron un patrón de respuesta similar contra antígenos de 8 kDa (en ambas clases se observaron bandas contra antígenos de 8-kDa, siendo mayor el número de bandas de 8-kDa [88] en la clase 4 en comparación a la clase 3), su inclusión como clases distintas mejoró la interpretación de las demás clases en el modelo.

La correlación entre los patrones de bandas de EITB y los resultados de neuroimágenes, específicamente la frecuencia de la presencia de cisticercos viables aparentemente concuerda con la naturaleza biológica de cada familia antigénica. Como pudimos observar, la proporción de casos con NCC viable y NCC calcificada fue diferente según las clases correspondientes a las respuestas de EITB. Más del 90% de los casos en la clase 1 solo presentaron NCC calcificada. La poca correlación de la banda GP50 del EITB con infección viable en pacientes en la clase 1 podría darse porque los anticuerpos contra GP50 tienden a persistir por mucho tiempo después de la muerte y resolución del cisticerco (hasta por 12 meses), resultando en un bajo valor predictivo de esta familia antigénica por si sola para detectar NCC viable [94, 114]. Por otro lado, en la clase 2 se pudieron observar una proporción muy similar de casos con NCC viable y NCC calcificada. Esto podría deberse a que en la clase 2 a los anticuerpos poco específicos contra GP50 se suman

respuestas contra los antígenos inmunodominantes de la familia T24/42 en las bandas GP42-39 y GP24, los cuales están presentes tanto en infecciones viables como no viables. Por otro lado, en las clases 3 y 4 se observó la mayor proporción de pacientes con NCC viable y con altas cargas parasitarias. Las respuestas de anticuerpos hacia antígenos de 8kDa (de naturaleza excretora / secretora) en las clases 3 y 4 podrían ser más específicas en presencia de infección viable, lo cual explicaría su alto valor predictivo positivo. Adicionalmente, podrían negativizar más rápidamente luego de la muerte del parásito.

La combinación de los patrones de bandas de EITB con los resultados de Ag-ELISA permitió identificar grupos de pacientes con alta probabilidad de NCC viable que requieren tratamiento antiparasitario, pero que no eran identificables al solo usar positividad al EITB o al Ag-ELISA. La adición de resultados de Ag-ELISA en pacientes con patrones de EITB de clase 2 mejoró la capacidad de discriminar correctamente casos con NCC viable. En esta clase, la probabilidad de NCC viable para los casos positivos a Ag-ELISA fue 100%, casi el doble de la obtenida para pacientes con patrones de EITB de clase 2 solamente (53.2%). La clase 2 está definida por la positividad del EITB a las bandas GP42-39 y GP24 pertenecientes a la familia T24/42 [92], sin reactividad a las bandas de 8-kDa asociadas a infección viable que se observan en las clases 3 y 4 [90]. No obstante, existen otros antígenos de 8-kDa no evaluados en el EITB que pueden también estar presentes en las bandas GP24 y GP42-39, incluso en ausencia de reacción contra las bandas de menor peso molecular (GP21, GP18, GP14 y GP13) evaluadas en el EITB [90]. Por lo tanto, la adición de resultados positivos de Ag-ELISA en respuestas de EITB de clase 2

podrían estar identificando el subgrupo de pacientes que tienen NCC viable, pero expresan antígenos de 8-kDa fuera de las bandas de 8-kDa evaluadas en el EITB. Esta hipótesis debe ser evaluada en futuros estudios. Por otro lado, la capacidad de los resultados negativos de Ag-ELISA para descartar NCC viable en la clase 2 solo fueron moderados, ya que 27.5% (11/40) de los pacientes Ag-ELISA negativos en esta clase tuvieron NCC viable. Estos 11 pacientes con NCC viable, pero sin niveles de antígeno detectables solo tuvieron uno o dos cisticercos cerebrales, lo cual puede explicar sus resultados falsos-negativos de Ag-ELISA, tal vez debido a la menor sensibilidad del Ag-ELISA en infecciones leves [95].

En las clases 3 y 4 de EITB, la probabilidad de NCC viable en los pacientes fue en general alta (>80%). Esto demuestra la utilidad de estos patrones de bandas de EITB para identificar casos de NCC viable, aún sin utilizar resultados de Ag-ELISA, que podrían beneficiarse de tratamiento antiparasitario. La adición de resultados negativos de Ag-ELISA en las clases 3 y 4 solo mejoró la chance de discriminar casos sin NCC viable en la clase 3. Sin embargo, pragmáticamente no fue tan útil pues hubo muchos falsos positivos a Ag-ELISA en ambas clases, 50% y 100% respectivamente. En las clases 3 y 4, los casos con NCC viable pero que fueron negativos a Ag-ELISA tuvieron únicamente uno o dos cisticercos cerebrales, por lo que al igual que en la clase 2, los resultados falsos negativos a Ag-ELISA pueden deberse a su menor sensibilidad para detectar antígeno en infecciones cerebrales leves [92].

En la clase 1 de EITB no se pudo evaluar la utilidad de los resultados de Ag-ELISA para identificar NCC viable por solo haber dos casos con infección viable en esta clase, ya que la mayoría de los casos sintomáticos con NCC viable usualmente reaccionan a un mayor número de bandas de EITB [69]. Los resultados de Ag-ELISA identificaron un pequeño grupo de cuatro pacientes positivos, pero solo uno de ellos tuvo NCC viable, correspondiente a una infección con un solo cisticerco. Esto sugiere que el Ag-ELISA tal vez podría servir para identificar sub-grupos pequeños de pacientes que requieren un tamizaje adicional con imágenes para determinar si requieren tratamiento antiparasitario. Por otro lado, un resultado Ag-ELISA negativo en la clase 1 podría ser útil para descartar NCC viable, dados los bajos porcentajes de falsos negativos de Ag-ELISA en la clase 1 (2.8%), pues las respuestas de EITB en la clase 1 se asocian mayoritariamente a infección inactiva [94].

Algunas características de nuestro estudio merecen consideración especial, principalmente sobre la población de estudio y la posibilidad de generalización. Nosotros incluimos únicamente neuroimágenes y resultados de EITB y Ag-ELISA de pacientes con NCC parenquimal, por lo cual nuestros hallazgos no pueden ser generalizados a la población total hospitalaria. No obstante, nosotros decidimos incluir únicamente a estos pacientes debido a que estos casos representan el grupo más frecuente de pacientes con NCC en escenarios hospitalarios. Asimismo, la exclusión de pacientes con cisticercos transicionales o degenerados de nuestro estudio, lesiones no viables pero que podrían ser positivas en Ag-ELISA, podría haber mejorado la especificidad estimada de la serología, aunque probablemente en

poca medida por ser una fracción pequeña de todos los casos elegibles. Finalmente, algunos pacientes excluidos podrían haber tenido lesiones únicas o con pocos quistes no detectadas en la RM o TAC, lo cual podría implicar sesgo de selección hacia infecciones con más quistes viables.

Es importante considerar también las características de los diagnósticos y su impacto en los resultados y conclusiones. En la clase 1, la mayoría de los pacientes fueron EITB-negativos, por lo que no se excluye la posibilidad de que algunos hallazgos de NCC calcificada en las imágenes de estos casos puedan representar otras infecciones que presentan similitud en las lesiones en las neuroimágenes como tuberculosis cerebral o neurotoxocariasis, pero solo con un impacto menor en los falsos negativos a Ag-ELISA. Además, no se analizó la información clínica de los pacientes, aunque la falta de evaluación clínica no afectó nuestros resultados dado que todos los pacientes con NCC parenquimal en nuestro estudio fueron sintomáticos, independientemente de sus resultados de serología.

Los hallazgos de neuroimágenes en pacientes con NCC parenquimal no son siempre definitivos para identificar infección con NCC viable y dar el manejo clínico apropiado, ya que algunos hallazgos no pueden diferenciar NCC de otras patologías, mientras que algunas lesiones viables pueden pasar desapercibidas por la RM o TAC, por lo que el diagnóstico requiere la confirmación serológica. Nuestros hallazgos demuestran que el uso combinado de los resultados de Ag-ELISA y los patrones de bandas de EITB tienen buena capacidad de identificar o descartar grupos con alta probabilidad de tener NCC viable. En aquellos pacientes

con respuestas de EITB de clases 2 (y en menor medida pacientes con respuestas de clases 3 y 1) y con resultados Ag-ELISA positivos, así como aquellos pacientes con respuestas de EITB de clase 4 (independientemente de sus resultados de Ag-ELISA) los hallazgos de imágenes confirman una alta chance de tener NCC viable, lo cual amerita el tratamiento antiparasitario oportuno. Por otro lado, en pacientes Ag-ELISA negativos con respuestas de clases 2 y 3 existe una probabilidad importante de presentar infecciones cerebrales viables leves, que pueden pasar desapercibidas en métodos como la TAC, por lo que requerirían posterior evaluación con métodos más sensibles como la RM para definir el cuadro clínico y la terapéutica necesaria. Como se indica, nuestros resultados podrían servir además para priorizar tamizaje imagenológico y eventualmente tratamiento antiparasitario en zonas de escasos recursos donde las neuroimágenes no son accesibles. En este contexto, la combinación del Ag-ELISA con patrones de bandas de EITB nos permitiría identificar personas con una probabilidad alta de tener NCC viable y que deban ser trasladadas a hospitales para confirmación diagnóstica mediante métodos de imágenes altamente sensibles y un manejo clínico apropiado.

CAPÍTULO V

INVESTIGACIÓN II: Uso combinado de los patrones de bandas del ensayo de Electro Inmunotransferencia Blot (EITB) y ensayo de ELISA de captura de antígeno para el diagnóstico de cisticercosis viable en cerdos naturalmente infectados

Gianfranco Arroyo^{1,2}, Andrés G. Lescano¹, Luz M. Toribio¹, Javier A. Bustos^{1,2}, Yesenia Castillo¹, Victor Benavides¹, Pierre Dorny³, Robert H. Gilman⁴, Seth O'Neal⁵, Héctor H. García^{1,2} y Armando E. Gonzalez⁶; Grupo de Trabajo en Cisticercosis en el Perú[^]

¹Facultad de Salud Pública y Administración (GA, AGL), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias y Filosofía (JAB, YC, HHG) y Centro de Salud Global (GA, JAB, HHG), Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú; ²Unidad de Cisticercosis, Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, Lima, Perú; ³Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium; ⁴Department of International Health, Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, United States of America; ⁵School of Public Health, Oregon Health & Science University-Portland State University, Portland, Oregon, United States of America; ⁶Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru

[^]Otros miembros del Grupo de Trabajo en Cisticercosis en el Perú incluyen a Victor C. W. Tsang, PhD; Manuela Verástegui, PhD y Mirko Zimic, PhD

(Coordinación General); Sofía, Sánchez, MD y Manuel Martinez, MD (Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, Lima, Perú); Holger Mayta, PhD; Mónica Pajuelo, PhD y Miguel A. Orrego, MSc (Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú); Luis Gómez, MV, MSc; Ana Vargas, MV, MSc; Teresa López, MV, PhD; Eloy Gonzales, MV, MSc, PhD (Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú); Luz M. Moyano, MD, PhD; Ricardo Gamboa, MSc; Percy Vélchez, MSc; Claudio Muro (Grupo de Eliminación de Cisticercosis, Tumbes, Perú); Sukwan Handali, MD; John Noh (Centers for Diseases Control, Atlanta, Georgia, Estados Unidos de América); Theodore E. Nash (National Institute of Allergy, and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos de América) y John Friedland, PhD (Imperial College, Londres, Reino Unido).

Título corto. EITB y Ag-ELISA en cisticercosis porcina viable

Palabras clave. Cisticercosis porcina, EITB, ELISA, viable

Agradecimientos. Un agradecimiento especial al personal de la Unidad de Cisticercosis, Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, Lima, Perú (Erika Pérez y Karen Arteaga) por el procesamiento de muestras mediante EITB y al personal del Laboratorio de Inmunología Parasitaria, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú (Cindy Espinoza, Tatiana Razuri y Catherine Apaza) para el procesamiento de muestras mediante ELISA.

Financiamiento. Gianfranco Arroyo es estudiante del programa de Doctorado en Ciencias en Investigación Epidemiológicas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia financiado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (FONDECYT/CIENCIA ACTIVA, número de beca: EF033-235-2015). Este estudio recibió además financiamiento parcial por el Centro Fogarty de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos de América (números de becas D43TW001140 y D43TW007393).

V.1. Resumen

La detección de una o más bandas de anticuerpos en el ensayo de EITB en cisticercosis porcina indica exposición, más no necesariamente infección viable. No obstante, la respuesta de anticuerpos visualizada en los patrones de bandas de EITB en cerdos no ocurre al azar y su distribución parece reflejar el perfil de respuesta inmunológica contra las glicoproteínas del cisticerco pertenecientes a tres familias antigénicas (GP50, T24/42 y 8-kDa), lo que a su vez brindaría información sobre infección viable, aunque aún no ha sido evaluado integralmente. Por otro lado, la detección de antígeno en cerdos mediante Ag-ELISA tiene alta sensibilidad para discriminar cisticercosis viable, aunque su especificidad se ve seriamente afectada por las reacciones cruzadas con el cisticerco de *T. hydatigena*. No obstante, el uso combinado del Ag-ELISA con los patrones de bandas de EITB podría mejorar la capacidad para discriminar cisticercosis porcina viable. Este estudio evaluó registros de necropsia para el diagnóstico de cisticercosis viable por *T. solium*, patrones de bandas de EITB y resultados de Ag-ELISA de 469 cerdos naturalmente infectados provenientes de dos estudios poblacionales correspondientes a cerdos positivos o negativos a EITB ($n = 324$) y cerdos únicamente positivos ($n = 145$), ambos realizados en la costa norte del Perú. Los patrones de bandas de EITB fueron agrupados en clases mediante análisis de clases latentes y se evaluó la contribución de los resultados de Ag-ELISA con cada clase de respuestas de EITB para predecir o descartar cisticercosis viable. Se identificaron cuatro clases: 1 (EITB-negativo o únicamente positivo a GP50 [familia GP50], 263 cerdos), 2 (positivo a GP42-39 y GP24 [familia T24/42] con o sin reacción a GP50, 166 cerdos), 3 (positivo a GP50, GP42-39 y GP24 y además positivo a las bandas de 8-kDa GP14 y GP13, pero

negativos a GP21 y GP18, 31 cerdos) y 4 (positivo a GP50, GP42-39, GP24 y además positivo a las cuatro bandas de 8-kDa, 9 cerdos). Se observó una clara gradiente de cisticercosis viable entre las cuatro clases de EITB (1.9%, 18.7%, 61.3% y 100%, $P < 0.001$), al igual que las cargas parasitarias, que fueron más altas en las clases 4 y 3 en comparación a las clases 1 y 2 ($P < 0.001$). En general, los resultados Ag-ELISA negativos, solos o en combinación con patrones de bandas de EITB (clases 1, 2 y 3) permitieron descartar cisticercosis viable con un alto valor predictivo (>97%). No obstante, la capacidad de los resultados Ag-ELISA positivos para predecir infección viable fue baja, particularmente en cerdos con respuestas de EITB de clases 1 y 2 (3.7% y 27.1%), moderada en la clase 3 (67.9%) y no contribuyó en la clase 4 (todos los cerdos tuvieron infección viable, independientemente del Ag-ELISA). En el grupo de cerdos Ag-ELISA positivos de las clases 1 y 2 de EITB, los niveles de antígeno fueron uniformemente altos en presencia de *T. hydatigena* y no se observó una gradiente en los niveles de antígenos según las cargas parasitarias. Asimismo, el análisis de regresión logística ajustado por edad, sexo, presencia de cisticercos degenerados, nemátodos intestinales e infección por *T. hydatigena* demostró mayor chance de cisticercosis viable en presencia de niveles de antígenos muy altos, pero menor posibilidad de cisticercosis viable en machos y en presencia de infección por *T. hydatigena*. En poblaciones porcinas, los resultados Ag-ELISA negativos, solos con respuestas de EITB de clases 1, 2 y 3 permiten descartar cisticercosis viable adecuadamente, útil para monitorear la efectividad de los programas de control, aunque los resultados Ag-ELISA positivos con los patrones de bandas de EITB (principalmente clases 1 y 2) detectan cisticercosis viable óptimamente y deben interpretarse con cautela.

V.2. Introducción

Taenia solium, también conocida como la ‘tenia del cerdo’ ocasiona el complejo zoonótico teniasis/cisticercosis de carácter endémico en países en vías de desarrollo [10]. El ciclo biológico de *T. solium* incluye una fase intestinal definitiva en el humano (teniasis) y una fase tisular intermediaria en el cerdo y el humano (cisticercosis). La neurocisticercosis (NCC) es la infección cerebral por el cisticerco de *T. solium* y es la neuroparasitosis más común del humano [2, 11]. En zonas endémicas, la NCC es responsable de hasta 30% de los casos con epilepsia [10] y los datos actuales sugieren los costos debidos a la NCC exceden a los costos totales debidos a malaria y otras enfermedades desatendidas [106]. Por otro lado, la cisticercosis porcina es la infección en la musculatura y otros órganos del cerdo y constituye el reservorio de futuras tenias para el humano y además produce pérdidas económicas al campesino por la pérdida de valor comercial de la carne infectada [115].

El diagnóstico de cisticercosis porcina viable es un componente clave en las estrategias de tipo focalizadas para el control y eliminación de teniasis/cisticercosis, ya que la presencia de cerdos con infección viable se relaciona espacialmente con la presencia de portadores teniásicos cercanos, lo que permitiría facilitar el tamizaje, identificación y tratamiento de los teniásicos, reduciéndose así la carga de infección en la comunidad [76, 102]. No obstante, una de las principales limitaciones que ocurriría en la implementación de programas de control radicaría en la detección de infección viable en los cerdos. La necropsia es el estándar diagnóstico para cisticercosis porcina, pero al ser un examen post-mortem su implementación en

intervenciones en campo resulta poco práctico debido a los altos costos para la compra de cerdos y la búsqueda minuciosa de cerdos en las carcasas [74, 77]. El uso de registros de revisión de carcasas en mataderos tampoco resulta adecuado, ya que un gran porcentaje de los cerdos en zonas rurales no son beneficiados en canales por el temor al decomiso de sus animales siendo la principal actividad la matanza traspatio de cerdos sin control sanitario, lo que a su vez favorece el comercio clandestino de la carne infectada [43]. Con respecto a los métodos diagnósticos ante-mortem, el examen de lengua, aunque altamente específico requiere personal experimentado para ser realizado y además su sensibilidad es solo moderada en infecciones severas y mucho menor en infecciones leves [74, 75]. La ultrasonografía también ha sido evaluada, aunque su capacidad diagnóstica para infección viable es baja [78]. Por otro lado, los ensayos serológicos de EITB de detección de anticuerpos [83] y Ag-ELISA de detección de antígenos [96] han sido ampliamente utilizados en estudios epidemiológicos de cisticercosis porcina [36, 96], aunque los problemas relacionados a la poca especificidad para discriminar infección viable en ambos ensayos poden en debate su fin para este propósito.

El ensayo de EITB detecta bandas de anticuerpos contra siete glicoproteínas del cisticerco de *T. solium* (GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13) obtenidas mediante purificación en columnas de lentil-lectina y es considerado el ensayo serológico referencial para cisticercosis porcina [66, 83]. La presencia de una o más bandas de EITB es altamente sensible (100%) en cerdos con cisticercosis viable múltiple (determinado por examen de lengua y confirmado en necropsia) [74]. Sin embargo, debido a que el EITB detecta anticuerpos, la presencia de una o

más bandas de EITB solo demuestra exposición al parásito y no necesariamente indica cerdos con infección viable que puedan continuar el ciclo de transmisión de la enfermedad [82]. La alta prevalencia de anticuerpos en cerdos en zonas endémicas incluye cerdos con infección viable, infecciones degeneradas o resueltas, exposición o inmunidad pasiva [50, 89]. Existe además variaciones transitorias de positividad de bandas de anticuerpos en el EITB de cerdos naturalmente infectados lo que se debe a todos los factores previamente indicados relacionados a la dinámica de seroconversión contra cisticercosis porcina [82], pero que limitan la capacidad diagnóstica del diagnóstico de número de bandas de EITB para identificar infección viable en la población porcina y facilitar acciones de prevención y control.

A pesar de que los resultados de positividad a número de bandas EITB en cerdos naturalmente infectados no predicen adecuadamente infección viable, los patrones de bandas de EITB o la combinación de resultados de presencia/ausencia de cada banda podrían explicar mejor la probabilidad de infección viable en el hospedador. Los patrones de bandas de EITB no ocurren al azar ya que su distribución refleja el perfil de respuesta de anticuerpos contra las tres familias de antígenos contenidas en las glicoproteínas del cisticerco de *T. solium* [90-92]. La familia GP50 consiste en antígenos de tipo transmembrana que migran hacia la banda de mayor peso molecular del EITB (GP50) [91]. La familia T24/42 incluye un conjunto de tetraspaninas (antígenos involucrados en procesos de adhesión y proliferación) que migran hacia las bandas GP42-39 y GP24 del EITB [92]. La familia 8-kDa incluye a los antígenos de menor peso molecular que migran hacia las bandas GP21, GP18, GP14 y GP13 del EITB (y en algunas ocasiones migra hacia la banda GP24) y son

de naturaleza excretoria/secretoria [90]. El perfil de respuesta inmune de los cerdos es muy diverso, observándose respuestas de EITB que involucran a las bandas de 8-kDa más frecuentemente en cerdos con infecciones viables con altas cargas parasitarias, mientras que otro tipo de respuestas como la presencia únicamente de la banda GP50) pueden reflejar únicamente exposición o incluso indicar reacción cruzada con *T. hydatigena* [116, 117]. No obstante, la capacidad de los patrones de bandas de EITB para discriminar infección viable en cisticercosis porcina aún no ha sido evaluada integralmente.

Por otro lado, la detección de antígeno circulante del cisticerco de *T. solium* en suero de cerdos indica la presencia de infección viable en cerdos, evitando así la baja especificidad de la detección de anticuerpos en el EITB. Los formatos actuales de detección de antígeno mediante ensayo de Inmunoabsorbancia Ligada a Enzima (ELISA) se basan en el uso de anticuerpos monoclonales que han sido inicialmente desarrollados para el diagnóstico de cisticercosis bovina por *T. saginata* [71] pero posteriormente adaptados para su uso en cisticercosis porcina debido a la reacción cruzada específica con el género [75, 96]. Los resultados han demostrado niveles aceptables de sensibilidad de estos ensayos de Ag-ELISA en cerdos (68-84%). Sin embargo, los formatos de Ag-ELISA en cisticercosis porcina presentan baja especificidad (67-76%), principalmente debido a la frecuente e intensa reacción cruzada con *T. hydatigena* [75], parásito común en el cerdo cuya distribución coincide con la distribución de *T. solium*, por lo que la capacidad diagnóstica de la detección de antígeno en cisticercosis porcina viable es subóptima [75].

A pesar de las limitaciones propias de los ensayos de EITB y Ag-ELISA como herramientas serológicas para cisticercosis porcina, su uso combinado podría ayudar a discriminar entre cerdos con infección viable y no viable. La adición de los resultados de Ag-ELISA sobre los resultados de EITB podría ayudar a discriminar la presencia de cisticercosis viable en cerdos, mientras que la evaluación de patrones de bandas específicos de EITB podrían ayudar a identificar reacciones cruzadas con el cisticerco de *T. hydatigena* no detectadas en el Ag-ELISA. El presente estudio evaluó el uso combinado de los patrones de bandas de anticuerpos de EITB con los resultados de Ag-ELISA para el diagnóstico de cisticercosis viable en cerdos naturalmente infectados.

V.3. Materiales y métodos

V.3.1. Diseño de estudio, población y criterios de inclusión

Nuestro estudio es de tipo transversal de evaluación diagnóstica y utilizó archivos de sueros, resultados de EITB y los registros de necropsia de cerdos provenientes de dos estudios poblacionales de cisticercosis porcina realizados en comunidades rurales de los departamentos de Tumbes y Piura por el Grupo de Trabajo de Cisticercosis en el Perú [78, 102]. Dichos estudios fueron realizados previamente a la implementación de intervenciones para el control de la teniasis/cisticercosis, por lo cual los resultados de necropsia corresponden al diagnóstico basal de cisticercosis porcina en condiciones de campo.

Brevemente, los cerdos provenientes del estudio de Tumbes (estudio 1, año 2006, [102]) fueron adquiridos mediante compra a sus propietarios provenientes de 6 comunidades rurales. Aproximadamente 1 mes antes de las necropsias, se realizó el muestreo serológico de los cerdos mediante ensayo de EITB para detección de anticuerpos. Asimismo, a los propietarios se les ofreció una ronda de tratamiento antiparasitario y posterior evaluación de muestras de heces para diagnóstico parasitológico. Todos los cerdos en las 6 comunidades, de 1 o más meses de edad y de ambos sexos fueron elegibles para ser adquiridos. Por otro lado, en el estudio de Piura (estudio 2, año 2014, [78]), se realizó primero una encuesta serológica de cerdos en 8 comunidades rurales mediante análisis de EITB de detección de anticuerpos contra cisticercosis un mes antes de su compra y examen de necropsia. Posteriormente, se ofreció la compra de aquellos cerdos de 2 o más meses de edad, de ambos sexos y que resultaran positivos a 1 o más bandas de EITB. Los cerdos

adquiridos en ambos estudios fueron trasladados a las instalaciones del Centro de Salud Global (CSG) de Tumbes, mantenidos en corrales de descanso y posteriormente evaluados mediante necropsia y evaluación de carcasas. Durante las necropsias en ambos estudios se realizó la identificación de cisticercos *in situ*, los cuales fueron colectados y colectados y clasificados según sus características morfológicas como viables (estructuras vesiculares con contenido líquido opalescente y presencia del escólex invaginado en su interior) o degenerados (vesículas de contenido caseoso, de color blanquecino y ausencia de escólex en su interior). A partir de estos hallazgos fueron clasificados como positivos a infección viable (presencia de 1 o más cisticercos viables, con o sin cisticercos degenerados) o negativos a infección viable (ausencia de cisticercos viables o presencia únicamente de cisticercos degenerados). Se reportó además la carga parasitaria (número de cisticercos viables y de cisticercos degenerados) y la presencia de infección con la fase larvaria de *T. hydatigena* y la presencia de nemátodos intestinales. Por otro lado, en ambos estudios también se colectaron muestras de sangre durante las necropsias para la obtención de alicuotas de suero y su procesamiento mediante ensayo de EITB de detección de anticuerpos (número de bandas y presencia/ausencia de cada banda) según se ha descrito previamente [20, 98]. En nuestro estudio, únicamente se utilizaron los registros de necropsia y resultados de EITB de cerdos con muestras de suero de cantidad suficiente para procesamiento de Ag-ELISA B158/B60 para detección de antígeno.

V.3.2. Procedimientos de estudio

V.3.2.1. ELISA de captura de antígeno (Ag-ELISA)

Se realizó el ensayo de Ag-ELISA para detección de antígeno de cisticerco en las muestras porcino de ambos estudios. Para este ensayo se utilizaron los anticuerpos monoclonales B158/B60 previamente desarrollados para el diagnóstico de cisticercosis bovina por *T. saginata* [71] y posteriormente adaptados para el diagnóstico de cisticercosis porcina [75, 96]. El ensayo de Ag-ELISA fue realizado en el Laboratorio de Inmunología Parasitaria – Unidad de Cisticercosis de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Brevemente se colocó 100 µL de los anticuerpos de captura B158C11A10 en cada pocillo de las placas de ELISA y mantenidos en incubación por 1 hora a 37°C. Luego de un paso de lavado, se adicionó una solución de bloqueo (PBS-Tween 0.05%). Se agregó después 100 µL de suero de porcino en cada pocillo previamente tratado con TCA 5% (dilución 1:4) y se mantuvieron las placas en incubación por 15 minutos a 37°C. Luego de otro lavado de placas, se adicionó 100 µL de los anticuerpos de detección B60H8A4 marcados con biotina y se incubaron las placas por otros 15 minutos a 37°C. Se realizó un paso adicional de lavado de placas y luego se colocó en cada pocillo 100 µL de estreptavidina - HRP (dilución 1: 10000) y se dejó incubando. Posteriormente se adicionó una solución de OPD con buffer citrato y estreptavidina peroxidasa para la reacción enzimática, la cual se detuvo mediante adición de H₂SO₄. Se realizó la lectura de placas en un espectrofotómetro a 490/650 nm para obtener los valores de densidad óptica (DO) de cada muestra. Estos valores fueron divididos por el valor promedio de DO de un grupo de sueros negativos y se calculó el ratio de positividad

antigénica. Las muestras fueron consideradas positivas si el ratio antigénico fue mayor a 1.

V.3.3. Procesamiento de datos y análisis estadísticos

La información de necropsia (diagnóstico de cisticercosis viable, número de cisticercos viables, degenerados, presencia de *T. hydatigena* y nemátodos intestinales), resultados de EITB y Ag-ELISA, edad (meses) y sexo de los cerdos fueron descritos mediante estadísticos de resumen y comparados según estudio primario de procedencia. Mediante análisis de clases latentes los resultados dicotómicos (presencia o ausencia) de cada una de las siete bandas de EITB fueron agrupados como patrones de bandas en un menor número de clases homogéneas seleccionadas mediante métodos de estimación de máxima verosimilitud. Se formularon modelos con un número creciente de clases (2 a 6 clases) y se eligió el modelo más parsimonioso que maximice la varianza de las siete bandas con un menor número de clases. Se determinó el número óptimo de clases mediante evaluación de los criterios estadísticos de Akaike y de Bayes y además se evaluó la posible interpretación de las clases mediante la identificación de patrones de bandas representativos en cada clase. La estructura de las clases en el modelo fue analizada mediante las prevalencias de cada clase y las probabilidades condicionales de cada banda de EITB a cada clase. Se realizaron análisis bivariados entre las clases de respuestas de EITB (patrones de bandas) y las características de la población porcina (estudio de procedencia, edad [meses], sexo, diagnóstico de cisticercosis viable, cargas parasitarias con cisticercos viables y degenerados, resultados de Ag-ELISA, niveles de antígenos, presencia de *T. hydatigena* y de nemátodos). Se

evaluó la contribución de los resultados de Ag-ELISA con los patrones de EITB (clases) para discriminar la presencia de infección con cisticercos viables en los cerdos mediante comparación de resultados verdaderos positivos y falsos negativos de Ag-ELISA en cada clase utilizando la prueba exacta de Fisher. Todos los análisis fueron realizados en el programa estadístico RStudio v1.2.5001 [113] utilizando el paquete poLCA para el análisis de clases latentes y considerando un nivel de significancia de 5%.

V.3.4. Consideraciones éticas

El presente estudio ha sido aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación en Animales (CIEIA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (SIDISI 103656). Todos los procedimientos descritos en los estudios primarios también fueron previamente aprobados por los Comités de Ética en Animales de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

V.4. Resultados

Se analizaron un total de 469 registros de necropsias y resultados de EITB, así como sus respectivas muestras de suero las cuales fueron procesadas mediante Ag-ELISA (324 provenientes del estudio de Tumbes y 145 provenientes del estudio de Piura, Tabla 8). La mediana de edad de todos los cerdos fue de 8 meses (RIC: 3-18 meses), siendo esta mayor en los cerdos de Piura que en los cerdos de Tumbes (mediana: 9 meses [RIC: 7-12] comparado a mediana: 7 meses [RIC: 3-18], $P = 0.006$). Los porcentajes de cerdos macho y hembra fueron 45% y 55%, respectivamente y no diferentes según los estudios de procedencia ($P = 0.852$). Un total de 330 cerdos (70.4%) fueron positivos a 1 o más bandas de EITB, correspondientes a 185/324 (57.1%) cerdos del estudio de Tumbes y todos los 145 cerdos (100%) del estudio de Piura ($P = 0.001$). Se observó un mayor número de bandas de EITB en los cerdos del estudio de Piura en comparación al estudio de Tumbes (mediana: 3 bandas [RIC: 2-3] comparado a mediana: 1 banda [RIC: 0-2 bandas], $P < 0.001$). En los cerdos EITB-positivos ($N = 330$), las bandas más frecuentes fueron GP50 (94.6%), GP42-39 (62.4%) y GP24 (53.9%), mientras que las bandas de menor peso molecular fueron menos frecuentes (GP21 [2.7%], GP18 [2.7%], GP14 [10.6%] y GP13 [7.6%], respectivamente). La banda GP50 fue más frecuente en los cerdos EITB-positivos del estudio de Tumbes que los cerdos de Piura (98.4% comparado a 89.7%, $P < 0.001$), mientras que todas las demás bandas de EITB fueron más frecuentes en los cerdos de Piura comparado a los cerdos de Tumbes ($P < 0.001$). Un total de 278 cerdos (59.3%) fueron positivos a Ag-ELISA, siendo el porcentaje de cerdos Ag-ELISA positivos y los niveles de antígeno correspondientes estadísticamente mayores en los cerdos del estudio de Piura que en el estudio de

Tumbes (todos los $P < 0.001$). De los 469 cerdos evaluados mediante examen de necropsia, 64 (13.7%) tuvieron cisticercosis viable (con o sin presencia de cisticercos degenerados), 37 (7.9%) tuvieron únicamente cisticercos degenerados y 368 (78.5%) fueron negativos a cisticercos (tanto viables como degenerados). Los porcentajes de cerdos con cisticercosis viable y degenerada fueron más altos en el estudio de Piura que en el estudio de Tumbes ($P < 0.001$), aunque las cargas parasitarias no fueron estadísticamente diferentes. Por otro lado, un total de 118 cerdos (25.2%) fueron positivos a cisticercosis por *T. hydatigena*, siendo los porcentajes similares en los dos estudios primarios de procedencia. Se identificó además la presencia de nemátodos en 121 cerdos (25.8%), siendo el porcentaje más alto en los cerdos de Tumbes comparado a los cerdos de Piura (34.6% comparado a 6.2%, $P < 0.001$).

Tabla 8. Características de la población porcina total y según estudio primario

Variables	Total (N = 469)	Estudio primario		P
		Tumbes (N = 324)	Piura (N = 145)	
Edad (meses)[‡]	8 (3-18)	7 (3-18)	9 (7-12)	0.006*
>8 meses	234 (49.9)	150 (46.3)	84 (57.9)	0.020**
≤8 meses	235 (50.1)	174 (53.7)	61 (42.1)	
Sexo				
Hembra	259 (55.2)	178 (54.9)	81 (55.9)	0.852**
Macho	210 (44.8)	146 (45.1)	64 (44.1)	
Resultados de EITB				
Positivo	330 (70.4)	185 (57.1)	145 (100.0)	0.001**
GP50	312 (94.6)	182 (98.4)	130 (89.7)	0.001**
GP42-39	206 (62.4)	84 (45.4)	122 (84.1)	< 0.001**
GP24	178 (53.9)	80 (43.2)	98 (67.6)	< 0.001**
GP21	9 (2.7)	0 (0.0)	9 (6.2)	0.001**
GP18	9 (2.7)	0 (0.0)	9 (6.2)	0.001**
GP14	35 (10.6)	1 (0.6)	34 (23.6)	< 0.001**
GP13	25 (7.6)	6 (3.2)	19 (13.1)	0.001**
Número de bandas [‡]	1 (0-3)	1 (0-2)	3 (2-3)	< 0.001*
0	139 (29.6)	139 (42.9)	0 (0.0)	
1	124 (26.4)	101 (31.2)	23 (15.9)	
2	46 (9.8)	7 (2.2)	39 (26.9)	
3	120 (25.6)	71 (21.9)	49 (33.8)	
4	20 (4.3)	5 (1.5)	15 (10.3)	
5	11 (2.4)	1 (0.3)	10 (6.9)	
6	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
7	9 (1.9)	0 (0.0)	9 (6.2)	
Resultados de Ag-ELISA				
Positivo	278 (59.3)	170 (52.5)	108 (74.5)	< 0.001**
Ratio antigénico [‡]	6.0 (0.7-48.1)	3.2 (0.6-47.8)	11.0 (0.9-48.6)	< 0.001*
Hallazgos de necropsia a cisticercosis				
Negativo	368 (78.5)	285 (87.9)	83 (57.2)	< 0.001**
Positivo, únicamente con cisticercos degenerados	37 (7.9)	21 (6.5)	16 (11.0)	
Positivo, con al menos un cisticercos viable (con/sin cisticercos degenerados)	64 (13.7)	18 (5.6)	46 (31.7)	
Nº de cisticercos viables [‡]	3 (173)	2 (1-54)	4 (1-89)	0.275*
Nº de cisticercos degenerados [‡]	1 (15)	2 (1-8)	1 (13)	0.115*
Presencia de cisticercosis por <i>T. hydatigena</i>	118 (25.2)	88 (27.2)	30 (20.7)	0.136**
Presencia de nemátodos intestinales	121 (25.8)	112 (34.6)	9 (6.2)	< 0.001**

[‡]Mediana (rango intercuartílico)

*Valor P obtenido mediante análisis de Kruskal Wallis

**Valor P obtenido mediante análisis de Chi cuadrado

Se identificaron nueve patrones de bandas de EITB en la población porcina total, los cuales fueron incluidos en el análisis de clases latentes. Los criterios de información de Akaike y Bayes identificaron a los modelos con cuatro y tres clases respectivamente como óptimos con la mejor bondad ajuste (menores valores de verosimilitud) para agrupar los patrones de bandas de EITB (ver Tabla 9). No obstante, se eligió al modelo de cuatro clases debido a que éste permitió agrupar los patrones de bandas de EITB que representaban mejor las respuestas contra las familias antigénicas del cisticerco de *T. solium*, no evidenciada en el modelo de tres clases.

Tabla 9. Estadísticos de bondad de ajuste para determinar el número óptimo de clases para patrones de bandas de EITB en el análisis de clases latentes

Criterios de información	2 clases	3 clases	4 clases	5 clases	6 clases
Akaike	1810.82	1664.24	1642.18*	1650.76	1666.76
Bayes	1873.07	1759.70*	1770.85	1812.63	1861.84

*Número óptimo de clases según el criterio de información

Brevemente, la clase 1 (263 cerdos, 0 o 1 bandas reactivas, 2 patrones de bandas) agrupó respuestas de EITB–negativas o positivas únicamente a la banda GP50 (perteneciente a la familia antigénica GP50). La clase 2 (166 cerdos, 2 o 3 bandas reactivas, 3 patrones de bandas) agrupó a los cerdos positivos a las bandas GP42-39 y/o GP24 (pertenecientes a la familia antigénica T24/42), independientemente de la reacción contra GP50. La clase 3 (31 cerdos, 4 a 5 bandas reactivas, 3 patrones de bandas) agrupó a los cerdos positivos a las bandas GP50, GP42-39 y GP24 (familias GP50 y T24/42) y además positivos a las bandas de 8-kDa GP14 y/o GP13. La clase 4 (9 cerdos, 7 bandas reactivas, un solo patrón) agrupó a los cerdos positivos a las bandas GP50, GP42-39, GP24, y además positivos a todas las bandas de 8–kDa (GP21, GP18, GP14 y GP13, Tabla 10). Las prevalencias de cada clase y las probabilidades de pertenencia a clases para cada banda de EITB son presentadas en la Tabla 11.

Tabla 10. Descripción de clases* y distribución de patrones de bandas de EITB

en cada clase

<u>Descripción de clases</u>	N	Nº de bandas reactivas	Patrones de bandas[†]	n (%)
<u>Clase 1</u>				
EITB-negativo o únicamente	263	0	0000000	139 (52.9)
positivo a antígenos de la		1	1000000	124 (47.2)
familia GP50 (0-1 bandas				
reactivas, 2 patrones)				
<u>Clase 2</u>				
Positivo a antígenos de la	166	2	0110000	18 (10.8)
familia T24/42, con o sin		2	1100000	28 (16.9)
reacción contra GP50, pero		3	1110000	120 (72.3)
negativos a antígenos de 8-				
kDa (2-3 bandas reactivas, 3				
patrones)				
<u>Clase 3</u>				
Positivo a antígenos de las	31	4	1110001	5 (16.1)
familias GP50, T24/42 y		4	1110010	15 (48.4)
positivo a antígenos de la		5	1110011	11 (35.5)
familia de 8-kDa (sin				
reacción a GP21 y GP18, 5				
bandas reactivas, 3 patrones)				
<u>Clase 4</u>				
Positivo a antígenos de las	9	7	1111111	9 (100.0)
familias GP50, T24/42 y				
positivo a todos los				
antígenos de la familia de				
8kDa (7 bandas reactivas, 1				
solo patrón)				

*Las clases fueron definidas mediante el criterio estadístico de Akaike

†Valores 1 y 0 indican la presencia o ausencia de cada una de las bandas de EITB (GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14 and GP13).

Tabla 11. Probabilidades condicionales de pertenencia a clases para cada banda y prevalencias de cada clase según el modelo de 4 clases latentes

Bandas de EITB	Clases[†]			
	1	2	3	4
GP50	47.2	88.7	100.0	100.0
GP42-39	0.0	100.0	100.0	100.0
GP24	0.0	82.5	100.0	100.0
GP21	0.0	0.0	0.0	100.0
GP18	0.0	0.0	0.0	100.0
GP14	0.0	0.0	69.8	100.0
GP13	0.0	0.0	42.9	100.0
<u>Prevalencia de cada clase (%)</u>	56.1	35.4	6.6	1.9

[†]Clases: 1 (EITB-negativo o positivo únicamente a antígenos de la familia GP50, 0-1 bandas reactivas, 2 patrones); 2 (positivo a antígenos de la familia antigénica T24/42, con o sin reacción a GP50, pero negativos a antígenos de 8-kDa, 2-3 bandas reactivas, 3 patrones); 3 (positivo a antígenos de las familias antigénicas GP50 y T24/42 y además positivo a antígenos de la familia antigénica de 8-kDa [sin reacción a GP21 y GP18], 4-5 bandas reactivas, 3 patrones); 4 (positivo a antígenos de las familias GP50 y T24/42 y además fuertemente positivos a todos los antígenos de 8-kDa, 7 bandas reactivas, 1 solo patrón).

El análisis bivariado no demostró asociación estadística entre las clases (patrones de bandas de EITB) con respecto al sexo, la carga parasitaria con cisticercos degenerados, presencia de infección con *T. hydatigena* y con nemátodos intestinales. No obstante, se encontró asociación entre las clases de respuestas de EITB según el estudio de procedencia ($P < 0.001$), siendo las respuestas de EITB de clase 1 más frecuentes en el estudio de Tumbes y las respuestas de clases 3 y 4 más frecuentes en el estudio de Piura. Se observó una mayor mediana de edad en los cerdos en las clases 3 y 4 (mediana: 10 meses [RIC: 8 -15] y mediana: 12 meses [RIC: 10-17]) en comparación a las clases 1 y 2 (mediana: 6 meses [RIC: 3-18] y mediana: 9 meses [6-14], $P < 0.001$). También se observó una clara gradiente en el porcentaje de cerdos con cisticercosis viable y en el número de cisticercos viables según las clases de respuestas de EITB (todos los $P < 0.001$). Se observó un mayor porcentaje de cerdos con cisticercosis porcina viable en las clases 3 y 4 (61.3% [19/31] y 100% [9/9]) en comparación a las clases 1 y 2 (1.9% [5/263] y 18.7% [31/166]). Las cargas parasitarias con cisticercos viables también fueron más altas en las clases 3 y 4 en comparación a la clase 2, mientras que todos los cerdos con cisticercosis viable en la clase 1 únicamente presentaron infecciones con un solo cisticerco. Asimismo, los porcentajes de cerdos Ag-ELISA positivos fueron altos en las clases 4 y 3 (90.3% [28/31] y 100% [9/9]) en comparación a las clases 1 y 2 (50.9% [134/263] y 64.5% [107/166]) y la misma tendencia se observó con respecto a los niveles de antígeno ($P < 0.001$, Tabla 12).

Tabla 12. Características de la población porcina según patrones de bandas de EITB (clases*)

Variables	Clase 1 (N=263)	Clase 2 (N=166)	Clase 3 (N=31)	Clase 4 (N=9)	P
Procedencia					
Tumbes	240 (91.3)	78 (47.0)	6 (19.4)	0 (0.0)	<0.001**
Piura	23 (8.7)	88 (53.0)	25 (80.6)	9 (100.0)	
Edad (meses) ‡	6 (3-18)	9 (6-14)	10 (8-15)	12 (10-17)	<0.001***
≤8	152 (57.8)	73 (44.0)	9 (29.0)	1 (11.1)	
>8	111 (42.2)	93 (56.0)	22 (71.0)	8 (88.9)	
Sexo					
Macho	120 (45.6)	72 (43.4)	13 (41.9)	5 (55.6)	0.856**
Hembra	143 (54.4)	94 (56.6)	18 (58.1)	4 (44.4)	
Ag-ELISA					
Positivo	134 (50.6)	107 (64.5)	28 (90.3)	9 (100.0)	<0.001**
Ratio antigénico ‡	1.4	6.4	39.6	51.5	
	(0.6-46.1)	(0.7-48.3)	(2.5-50.2)	(48.9-52.0)	<0.001***
Cisticercosis viable					
Positivo	5 (1.9)	31 (18.7)	19 (61.3)	9 (100.0)	<0.001**
Negativo	258 (98.1)	135 (81.3)	12 (38.7)	0 (0.0)	
Nº de cisticercos viables ‡	1 (-)	1 (1-4)	13 (2-54)	2114 (54-3815)	<0.001***
Nº de cisticercos degenerados ‡	6 (2-12)	4 (3-14)	7 (4-16)	4 (-)	0.797***
Presencia cisticercosis por <i>T. hydatigena</i>	62 (23.6)	44 (26.5)	10 (32.3)	2 (22.2)	0.740**
Presencia de nemátodos intestinales	76 (28.9)	40 (24.1)	5 (6.1)	0 (0.0)	0.105**

*Clases: 1 (EITB-negativo o positivo únicamente a antígenos de la familia GP50, 0-1 bandas reactivas, 2 patrones); 2 (positivo a antígenos de la familia antigénica T24/42, con o sin reacción a GP50, pero negativos a antígenos de 8-kDa, 2-3 bandas reactivas, 3 patrones); 3 (positivo a antígenos de las familias antigénicas GP50 y T24/42 y además positivo a antígenos de la familia antigénica de 8 kDa [sin reacción a GP21 y GP18], 4-5 bandas reactivas, 3 patrones); 4 (positivo a antígenos de las familias GP50 y T24/42 y además fuertemente positivos a todos los antígenos de 8 kDa, 7 bandas reactivas, 1 solo patrón).

†Media ± desviación estándar

‡Mediana (rango intercuartílico)

**Valor P obtenido mediante análisis de Chi cuadrado

***Valor P obtenido mediante análisis de Kruskal Wallis

Los resultados de negativos de Ag-ELISA permitieron descartar infecciones viables en cerdos con una alta precisión, ya que únicamente se observaron 2/191 (1.1%) cerdos falsos negativos a Ag-ELISA, correspondientes a 2 animales pertenecientes a clase 2 de EITB. Por otro lado, la selección de cerdos con resultados Ag-ELISA positivos en las clases de respuestas de EITB 1 y 2 tuvo muy baja capacidad de predecir infección viable (5/139 [3.7%] en la clase 1 y 29/107 [27.1%] en la clase 2, respectivamente), mientras que en la clase 3 la capacidad de detectar cisticercosis viable en presencia de resultados Ag-ELISA positivos fue moderada (19/28 [67.9%]), mientras que en la clase 4 los resultados positivos de Ag-ELISA no contribuyeron al diagnóstico de viabilidad ya que todos los cerdos en esta clase tuvieron cisticercosis viable y también fueron positivos a Ag-ELISA (Tabla 13).

Tabla 13. Distribución de cerdos con cisticercosis viable según patrones de bandas de EITB y resultados de Ag-ELISA

Clases*	Cisticercosis viable			P
	Total (N = 469)	Ag-ELISA positivo (N = 278)	Ag-ELISA negativo (N = 191)	
<u>Total</u>	64/469 (13.7)	62/278 (22.3)	2/191 (1.1)	<0.001
Clase 1	5/263 (1.9)	5/139 (3.7)	0/129 (0.0)	0.060
Clase 2	31/166 (18.7)	29/107 (27.1)	2/59 (3.4)	<0.001
Clase 3	19/31 (61.3)	19/28 (67.9)	0/3 (0.0)	0.049
Clase 4	9/9 (100.0)	9/9 (100.0)	—	—

*Clases: 1 (EITB-negativo o positivo únicamente a antígenos de la familia GP50, 0-1 bandas reactivas, 2 patrones); 2 (positivo a antígenos de la familia antigénica T24/42, con o sin reacción a GP50, pero negativos a antígenos de 8-kDa, 2-3 bandas reactivas, 3 patrones); 3 (positivo a antígenos de las familias antigénicas GP50 y T24/42 y además positivo a antígenos de la familia antigénica de 8 kDa [sin reacción contra GP21 y GP18], 4-5 bandas reactivas, 3 patrones); 4 (positivo a antígenos de las familias GP50 y T24/42 y además fuertemente positivos a todos los antígenos de 8 kDa, 7 bandas reactivas, 1 solo patrón).

La poca capacidad de los resultados de Ag-ELISA positivos para identificar cerdos con cisticercosis viable en las clases 1 y 2 de EITB podría ilustrar el rol de la reacción cruzada del Ag-ELISA con la presencia de infección con cisticercosis por *T. hydatigena* en los cerdos. Por ello, un análisis en el subgrupo de cerdos con respuestas de EITB de clases 1 y 2 y Ag-ELISA positivos (n = 241) demostró que en presencia de cisticercosis por *T. hydatigena* los niveles de antígenos fueron extremadamente altos (ratios antigénicos >50), independientemente de las categorías de carga parasitaria con cisticercos viables de *T. solium* en los cerdos ($P = 0.402$, Tabla 14). Por otro lado, en ausencia de infección con cisticercosis por *T. hydatigena*, tampoco se observó una gradiente clara en los niveles de antígeno según las categorías de cargas parasitarias, ya que si bien los niveles de antígeno fueron altos en el único cerdo con más de 10 cisticercos (ratio antigénico = 51.3), los niveles de antígeno en los cerdos sin infección viable fueron más altos a los niveles obtenidos en cerdos con 1 a 10 cisticercos viables (Tabla 14).

Tabla 14. Niveles de antígeno en cerdos con patrones de bandas de EITB de clases 1 y 2 y positivos a Ag-ELISA según número de cisticercos viables en presencia o ausencia de *T. hydatigena* (N = 241)

Número de cisticercos viables	Cerdos negativos a <i>T. hydatigena</i>			Cerdos positivos a <i>T. hydatigena</i>		
	n	Mediana (RIC)	P	n	Mediana (RIC)	P
0	115	28.4 (6.4-44.9)	0.973	92	50.8 (47.4-53.8)	0.402
1-10	20	13.3 (3.2-44.4)		9	51.4 (46.0-52.9)	
+100	1	51.3 (-)		4	52.4 (51.1-53.3)	

RIC: rango intercuartílico

Adicionalmente se realizó un análisis de regresión logística para evaluar la asociación entre las características en los cerdos y la presencia de cisticercosis porcina en el subgrupo de animales de las clases 1 y 2 de EITB y Ag-ELISA (Tabla 15). Luego del ajuste por edad, sexo, presencia de cisticercosis por *T. hydatigena*, presencia de nemátodos intestinales y de cisticercos degenerados en la necropsia pudimos observar una mayor chance de cisticercosis viable en cerdos con niveles de antígeno muy altos (OR = 2.15 para niveles de antígeno en el tercer tercil [ratio antigénico >49.7] en comparación a niveles de antígeno en el primer tercil [ratio antigénico ≤30.0], $P = 0.012$), mientras que la chance de cisticercosis viable en cerdos con niveles de antígeno en el segundo tercil (ratio antigénico >30.0 a ≤49.7) fue menor en comparación al primer tercil (OR = 0.69, $P = 0.001$). Además, otros factores asociados con cisticercos viable en el modelo multivariado fueron el sexo, siendo la chance de cisticercosis viable menor en machos que en hembras (OR = 0.38, $P = 0.001$) y también menor en presencia de cisticercosis por *T. hydatigena* (OR = 0.37, $P = 0.001$). Además, se observó tendencia a una mayor chance de cisticercosis viable en presencia de nemátodos intestinales (OR = 1.30, $P = 0.136$).

Tabla 15. Modelos de regresión logística * para la estimación de odds ratios de la presencia de cisticercosis viable en cerdos con patrones de bandas de EITB de clases* 1 y 2 y Ag-ELISA positivos según variables de estudio (N = 241).

Variables de estudio	Modelo bivariado		Modelo multivariado	
	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
Edad (meses)				
≤8	Ref.		Ref.	
>8	2.91 (0.53-16.32)	0.224	2.53 (0.69-9.27)	0.160
Sexo				
Hembra	Ref.		Ref.	
Macho	0.38 (0.31-0.47)	0.001	0.43 (0.39-0.46)	0.001
Terciles de nivel de antígeno Ag-ELISA				
1 (≤30.0)	Ref.		Ref.	
2 (>30.0 a ≤49.7)	0.64 (0.36-1.14)	0.132	0.69 (0.67-0.71)	0.001
3 (>49.7)	1.22 (0.49-3.07)	0.673	2.15 (1.18-3.89)	0.012
Cisticercosis por <i>T. hydatigena</i>				
Negativo	Ref.		Ref.	
Positivo	0.77 (0.30-1.99)	0.594	0.37 (0.34-0.41)	0.001
Presencia de nemátodos				
No	Ref.		Ref.	
Si	1.29 (1.09-1.52)	0.003	1.30 (0.92-1.85)	0.136
Presencia de cisticercos degenerados				
No	Ref.		Ref.	
Si	2.72 (0.19-8.71)	0.460	2.37 (0.24-23.42)	0.459

*Los modelos de regresión logísticas fueron estimados con varianzas robustas tipo sándwich para corregir la correlación de los datos según el estudio primario de procedencia

OR: Odds ratio, IC: intervalo de confianza de 95%

V.5. Discusión

El diagnóstico serológico en cisticercosis viable en cerdos naturalmente infectados presenta limitaciones principalmente debido a la especificidad sub-óptima para detección de viabilidad de los ensayos de EITB y Ag-ELISA. A diferencia del humano, el desarrollo de cisticercosis y la respuesta inmune en el cerdo definida por los resultados de EITB están afectados por diferentes factores como por ejemplo una mayor dosis infectiva de huevos (debido al hábito coprofágico del cerdo) [118], el período de vida más corto del cerdo en campo [50], la exposición e infección a un número mayor de parásitos en el ambiente y el fenómeno de inmunidad materna pasiva [89]. Adicionalmente, la capacidad diagnóstica del Ag-ELISA es fuertemente afectada por la reacción cruzada con *T. hydatigena* [75]. No obstante, Nuestros resultados indican que el uso combinado de los resultados negativos de Ag-ELISA permiten descartar adecuadamente la presencia de infección viable en cerdos, aunque la combinación de resultados Ag-ELISA positivos con los patrones de bandas de EITB no mejora importantemente la capacidad de predecir cisticercosis porcina viable de manera correcta, especialmente en cerdos con patrones de EITB de clases 1 y 2, lo cual por lo cual su uso para este propósito debe ser interpretado con cautela.

La detección de anticuerpos en el EITB en cerdos indica exposición, pero no necesariamente infección viable. Por ello, la positividad a número de bandas de EITB ha sido utilizado en diferentes estudios epidemiológicos para caracterizar el riesgo de transmisión de *T. solium* [49]. Debido a la discrepancia reportada entre la presencia de una o más bandas de EITB y el diagnóstico de cisticercosis porcina

viable en estudios previos, se han sugerido incrementos en el punto de corte diagnóstico de número de bandas de EITB (siendo 3 o más bandas el más adecuado en términos de sensibilidad y especificidad) [82]. No obstante, las respuestas de anticuerpos de EITB no reflejan solamente el número de bandas positivas, sino principalmente el patrón de ocurrencia de éstas, las cuales se asocian con las respuestas a las familias antigénicas del cisticerco *T. solium*. En nuestro estudio, pudimos agrupar los patrones de bandas de EITB en cuatro clases mediante análisis de clases latentes. Estas clases reflejan puntualmente el perfil de respuestas a familia antigénica bien definidas: la clase 1 se relacionó a antígenos de la familia GP50, la clase con la familia T24/42 y las clases 3 y 4 con la familia de 8-kDa). La presencia de anticuerpos contra GP50 (clase 1), GP42-39 y GP24 (clase 2) son las más frecuentes en población porcina ya que estos antígenos en estas clases son inmunodominantes. Por otro lado, en nuestro estudio las respuestas de EITB de clases 3 y 4 solo representaron menos del 10% de la población porcina total. Si bien clase 4 solo agrupó a nueve cerdos, su inclusión como clase separada permitió diferenciar de las demás clases a los cerdos positivos a todas las bandas del EITB.

El mayor porcentaje de cerdos con cisticercosis viable y las cargas parasitarias más altas se observaron en presencia de respuestas de anticuerpos de clases 3 y 4. Estas clases siempre involucraron las respuestas de anticuerpos contra las glicoproteínas más pesadas del EITB (GP50, GP42-39 y GP24), pero además la presencia de las bandas de anticuerpos contra las glicoproteínas más pequeñas (GP21, GP18, GP14 y/o GP13) de 8-kDa. Este tipo de patrones de bandas corresponden a cuatro o más bandas diagnósticas visualizadas y un estudio previo considerando este punto de

corte diagnóstico de bandas demuestran su mayor poder predictivo para el diagnóstico de cisticercosis viable con altas cargas parasitarias [87, 119].

La presencia de un mayor porcentaje de cerdos con respuestas de EITB de clases 3 y 4 en el estudio de Piura que en de Tumbes, podría reflejar diferencias en las tasas de infección en las poblaciones porcinas de ambos estudios. Las seroprevalencias de cisticercosis porcina mediante EITB no puede compararse entre los estudios de Piura y Tumbes, ya que el primer estudio incluye únicamente cerdos EITB-positivos. Sin embargo, la presencia de un mayor número con respuestas de EITB de clases 3 y 4 (asociadas a la presencia de un teniásico cercano) en el estudio de Piura [78] podría sugerir una mayor prevalencia de teniasis humana en comparación al estudio de Tumbes, donde sólo se detectaron 4 teniásicos [102]. Por otro lado, la presencia de cerdos de mayor edad (>8 meses) con respuestas de EITB que involucran un mayor número de bandas (clases 3 y 4) sugieren un mayor período de exposición y/o exposición reiterada y acumulada a *T. solium* en el ambiente y por lo tanto mayor tiempo hasta la aparición de inmunidad contra estas glicoproteínas de 8-kDa ya que en estudios experimentales en cerdos son las últimas bandas de EITB en aparecer [120].

Diferencias en el poder predictivo de cisticercosis viable entre las clases 3 y 4 (61% comparado a 100%) pueden ser explicada por la presencia de un mayor número de bandas de 8-kDa en la clase 4 en comparación a la clase 3. Los antígenos de la familia 8-kDa son de naturaleza excretoria-secretoria [90], por lo cual, a mayor número de cisticercos viables, mayor producción de estos antígenos y mayor

seroconversión. Los resultados de Ag-ELISA (porcentajes de positividad y ratios antigénicos) también fueron más altos en cerdos en las clases 3 y 4 de EITB comparado a las clases 1 y 2, lo que refleja la presencia de infecciones con mayor carga parasitaria con respuestas de EITB contra antígenos de 8-kDa en las clases 3 y 4. Por otro lado, la capacidad de predecir cisticercosis viable en las clases de EITB 1 y 2 fue baja, reflejando así su poco valor para determinar infección viable en estudios de campo. El alto porcentaje de resultados falsos positivos en las clases 1 y 2 de EITB puede deberse al carácter inmunodominantes de los antígenos GP50 y T24/42 en las clases 1 y 2 por lo que los anticuerpos contra estos antígenos pueden persistir por periodos extensos incluso luego de la muerte del parásito. Podría también tratarse de anticuerpos que son transferidos a lechones mediante el fenómeno de inmunidad pasiva [89], ya que al parecer los anticuerpos contra las bandas más pesadas (GP50, GP42-39 y GP24) son los últimos en desaparecer en lechones, pudiendo detectarse hasta por 35 semanas en crías de marranas infectadas bajo condiciones experimentales [89], aunque el análisis de patrones de bandas de EITB (clases) entre cerdos según categorías de edad (≤ 8 meses y > 8 meses) no demostró diferencias en el perfil de patrones de bandas (datos no presentados). Además, un porcentaje de cerdos falsos positivos en la clase 1 podrían estar conformados por aquellos cerdos positivos a la GP50 sola, ya que se ha demostrado reacción cruzada de esta banda con el cisticerco de *T. hydatigena* [116, 117].

Los resultados negativos de Ag-ELISA, con o sin patrones de bandas de EITB permitieron descartar infección viable en los cerdos naturalmente infectados de nuestro estudio con un alto valor predictivo ($> 97\%$). Estos resultados son similares

a un estudio previo que reporta un alto valor predictivo negativo del Ag-ELISA para descartar cisticercosis porcina y el uso potencial de estos resultados como herramienta para medir la efectividad de los programas de control contra teniasis/cisticercosis en la población porcina (confirmar la ausencia de infección viable) [121], además la caída de antígeno en cerdos experimentales post-tratamiento antiparasitario podría sugerir su uso como prueba para medir la cura de la infección en los animales [98]. Los dos únicos cerdos negativos a Ag-ELISA, pero con cisticercosis viable en nuestro estudio tuvieron infección con un solo cisticerco, lo cual explica estos falsos negativos debido a que la sensibilidad del Ag-ELISA es menor en infecciones leves [75]. Por el contrario, la capacidad de los resultados positivos a Ag-ELISA para identificar cerdos con cisticercosis viable fue baja (23%), y no mejoró en combinación con respuestas de EITB de clases 1 (3.7%) y 2 (27.1%). El análisis en el subgrupo de cerdos de las clases 1 y 2 de EITB y Ag-ELISA positivos demostró claramente el efecto de la presencia de la infección con cisticercosis con *T. hydatigena* sobre los resultados falsos positivos demostrado en estudios previos y que demuestran las limitaciones de los resultados positivos a Ag-ELISA con fines diagnósticos en cerdos naturalmente infectados en presencia de coinfección con *T. hydatigena* [75]. No obstante, es importante señalar que en el subgrupo de cerdos de las clases 1 y 2 de EITB y Ag-ELISA positivos se observaron también niveles de antígeno altos en ausencia de cisticercosis por *T. solium* y *T. hydatigena*. Niveles altos de antígeno en estos cerdos podrían deberse a infecciones transitorias, infecciones degeneradas recientes donde aún se pueden detectar antígenos [98] o infecciones recientes ya que experimentalmente los antígenos pueden elevarse entre el día 21 y 28 post-infección [97]. Aunque menos probable,

podría además deberse a infecciones viables leves (1 a 5 cisticercos) no detectadas en el examen de necropsia detallado o incluso sugerir posibles reacciones cruzadas con antígenos excretorios/secretorios de otros cestodos no reportados en la necropsia afectando la capacidad diagnóstica del Ag-ELISA [88]. Otros factores como por ejemplo la edad, sexo, e incluso la presencia de nemátodos o de cisticercos degenerados podrían alterar la relación entre los niveles de antígeno y la presencia de cisticercosis porcina en los cerdos con patrones de EITB de clases 1 y 2, por lo que los resultados Ag-ELISA positivos en cerdos en estas clases deben ser interpretados cuidadosamente para el diagnóstico poblacional de cisticercosis viable.

Algunas limitaciones en nuestro estudio merecen especial consideración. La inclusión de dos estudios primarios (Tumbes y Piura) diferentes con respecto a los porcentajes de cisticercosis y de seropositividad a EITB (ya que el estudio de Piura solo incluyó cerdos EITB-positivos para los exámenes de necropsia, mientras que en el estudio de Tumbes se realizó la necropsia a cerdos positivos o negativos a EITB) podrían afectar la generalizabilidad de nuestros hallazgos. Si bien intentamos corregir estas diferencias en el modelo de regresión logística utilizando varianzas “sándwich” para agrupar los datos según estudio primario de procedencia. Asimismo, esta falta de generalizabilidad de nuestros resultados solo ocurriría solo en la clase 1 del EITB y no en las demás clases de patrones de bandas de EITB. Diferencias en la temporalidad entre los estudios primarios (2006 para el estudio de Tumbes y 2014 para el estudio de Piura) podrían explicar también las diferencias en las tasas de teniasis/cisticercosis en las comunidades. Posterior a la intervención

basal en Tumbes se implementaron diferentes estrategias de control contra teniasis/cisticercosis lo que llevó a la eliminación de esta zoonosis de forma local [115], aunque es posible que potenciales nuevos focos de transmisión de *T. solium* hayan ocurrido en zonas como Piura, lo que explicaría las diferencias entre las tasas de teniasis en ambos estudios (1.4% en Tumbes y 2.4% en Piura). Finalmente, los ensayos de Ag-ELISA y EITB no son fácilmente aplicables en lugares endémicos remotos, ya que requieren equipamiento apropiado y de difícil acceso. No obstante, futuros estudios utilizando formatos de detección más sencillos podrían ser evaluados y validados como alternativas diagnósticas para ser aplicado en zonas endémicas y tomar decisiones en tiempo real.

En la teniasis/cisticercosis por *T. solium* los cerdos con cisticercosis viable constituyen el reservorio de teniasis para el humano, por lo cual su identificación y tratamiento es puede ser una herramienta clave en futuros programas de control [115]. El diagnóstico de adecuado de cisticercosis viable porcina mediante pruebas confiables y fácilmente aplicables en estudios de campo (como por ejemplo los formatos de detección rápida) es requerido para el control y eliminación de esta zoonosis. Nuestros resultados demuestran la capacidad de los resultados Ag-ELISA negativos para descartar cisticercosis viable con un alto poder predictivo, con un potencial uso para verificar la eliminación de la enfermedad en la población porcina debido a los programas de control, mientras que los resultados positivos de Ag-ELISA no detectan de cisticercosis viable con alta especificidad, principalmente en combinación con patrones de bandas de EITB de clases 1 y 2, aunque mejora moderadamente con patrones de bandas de clase 3 pero no aporta valor diagnóstico

en cerdos con patrones de bandas de clase 4. El alto porcentaje de falsos-positivos en cerdos de las clases 1 y 2 de EITB parece reflejar el efecto de la reacción cruzada de cisticercosis por *T. hydatigena*, pero también podría ocurrir con otros cestodos además de otras características en la población porcina, por lo que deben ser interpretados con cautela y validados en futuros estudios.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN INTEGRADA

La NCC continúa ocasionando una carga significativa en la salud pública debido al carácter crónico de la enfermedad neuronal y la morbilidad que genera en el paciente [1,2, 10]. Similarmente, la cisticercosis porcina produce pérdidas económicas al productor debido al desmedro del precio de la carne de cerdo infectada, la cual además constituye el reservorio de futuras tenias para el humano. El diagnóstico de NCC viable en entornos hospitalarios permite la clasificación correcta de pacientes que requieren un tratamiento antiparasitario apropiado para la resolución del parásito y a su vez favorecer en la evolución clínica de los pacientes [60, 61]. Por otro lado, el diagnóstico de cisticercosis viable en poblaciones porcinas permite conocer el nivel de transmisión con *T. solium* en estudios epidemiológicos, útil en las estrategias para prevenir su transmisión [115].

La distribución de los patrones de bandas de EITB no es aleatoria y puede proporcionar información sobre el estatus de infección en el hospedador intermediario en función al tipo de respuesta contra las familias antigénicas del cisticerco de *T. solium*. Los patrones de bandas identificados demuestran consistentemente que tanto en NCC humana como en cisticercosis porcina, la distribución de bandas de EITB según clases pueden ser agrupadas según su perfil de respuesta contra las familias antigénicas del cisticerco de *T. solium*. Observamos una mayor heterogeneidad en los patrones de bandas en pacientes con NCC (estudio 1, 16 combinaciones de bandas) que en la población porcina del estudio 2 (solo 9 combinaciones de bandas). Si bien, los cerdos rurales debido a sus conductas

alimenticias pueden estar más expuestos a *T. solium*, su período de vida es más corto en comparación a la NCC humana, lo cual podría explicar la menor heterogeneidad de respuestas de anticuerpos vista en los cerdos de nuestro estudio.

La contribución de resultados Ag-ELISA positivos con los patrones de bandas de EITB en pacientes con NCC parenquimal del estudio 1 fue tremendamente importante en aquellos casos con respuestas de EITB de clase 2 (respuesta contra antígenos T24/42), ya que en combinación proporcionaron un alto poder predictivo (100%) para detectar infecciones viables. En las clases 3 y 4 de EITB hubo un alto porcentaje de casos con NCC viable independiente de los resultados de Ag-ELISA, por lo que la detección de antígeno parece no aportar mayor capacidad diagnóstica de NCC viable en estas respuestas de EITB. Además, los resultados falsos negativos de Ag-ELISA en las clases 3 y 4 de EITB corresponden a casos con 1 o 2 cisticercos viables, por lo que en presencia de estos patrones de bandas la detección de antígeno no contribuye al diagnóstico de NCC viable. Por otro lado, en poblaciones porcinas de zonas endémicas a *T. solium*, los resultados negativos de Ag-ELISA principalmente permiten descartar cisticercosis viable en la población porcina, lo cual podría servir como herramienta para medir la eficacia de las intervenciones de control de teniasis/cisticercosis. No obstante, los resultados Ag-ELISA positivos no permiten detectar apropiadamente cerdos con infección viable, particularmente en los cerdos con respuestas de EITB de clases 1 y 2. El efecto potencial de la presencia de *T. hydatigena* sobre los resultados falsos positivos de Ag-ELISA en las clases 1 y 2 del EITB conlleva a interpretar con cautela los resultados Ag-ELISA positivos para fines diagnósticos de cisticercosis viable en poblaciones porcinas.

Existen algunas consideraciones sobre el uso de del EITB y Ag-ELISA para el diagnóstico de NCC humana viable y cisticercosis porcina viable respectivamente. Los ensayos de EITB y Ag-ELISA requieren equipamiento apropiado y principalmente están disponibles en hospitales donde su uso permite confirmar hallazgos de imágenes de NCC como reportamos en el estudio 1. Asimismo, en zonas rurales endémicas donde no hay acceso a neuroimágenes, el uso de formatos diagnósticos más accesibles como pruebas de detección rápida a partir de los antígenos del EITB y anticuerpos monoclonales del Ag-ELISA podrían ser fácilmente aplicables para identificar aquellas personas con diagnóstico probable de NCC viable que requieran ser referidas a hospitales de mayor nivel para confirmación apropiada mediante neuroimágenes. De la misma manera, el concepto obtenido del uso combinado de los patrones de bandas de EITB y Ag-ELISA en poblaciones porcinas podría transferirse hacia formatos rápidos de detección que combinen bandas de anticuerpos con mayor poder predictivo (8-kDa) [88] con la detección de antígeno para el diagnóstico combinado de anticuerpos y antígenos en cerdos en tiempo real bajo condiciones de campo, facilitando así los recursos para las intervenciones de control.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones del estudio 1:

- En pacientes sintomáticos con NCC parenquimal en entornos hospitalarios, la combinación de resultados positivos y negativos de Ag-ELISA con los patrones de bandas de EITB (principalmente respuestas de clase 2 relacionada a antígenos de la familia T24/42) permiten una mejor discriminación de los casos con NCC viable de aquellos con NCC no viable (calcificada).
- Los resultados combinados de Ag-ELISA y patrones de bandas de EITB complementan más apropiadamente a las neuroimágenes de pacientes con NCC parenquimal para definir el estatus de infección viable, permitiendo así un manejo clínico apropiado por el médico tratante mediante tratamiento antiparasitario en los casos con NCC viable, mientras que en casos con NCC no viable (calcificaciones) permite diferenciar un manejo de crisis convulsivas mediante el uso de antiepilépticos.
- La combinación de los patrones de bandas de EITB con los resultados de Ag-ELISA podría además servir para priorizar el tamizaje imagenológico de infección viable en zonas con escaso a métodos de neuroimágenes como la RM, permitiendo así derivar pacientes para su confirmación diagnóstica y tratamiento adecuado.

Conclusiones del estudio 2:

- En poblaciones porcinas de zonas endémicas a *T. solium*, los resultados negativos de Ag-ELISA permiten descartar cisticercosis viable con un alto valor predictivo, permitiendo el uso de estos resultados como una herramienta para medir la eficacia de las intervenciones de control en cerdos.
- Los resultados positivos de Ag-ELISA no detectan apropiadamente cisticercosis viable porcina, aunque mejora de forma moderada al combinarse con patrones de EITB de clase 3, pero no mejoran o solo mejora levemente en combinación con patrones de EITB de clases 1 y 2, mientras que no aporta al diagnóstico de cisticercosis viable en cerdos con respuestas de EITB de clase 4.
- Factores como la presencia de cisticercosis por *T. hydatigena* en cerdos e incluso otros cestodos y helmintos no detectados en el examen de necropsia podrían afectar de manera importante la especificidad de los resultados positivos de Ag-ELISA y los niveles de antígeno en los cerdos, principalmente con patrones de bandas de EITB de clases 1 y 2, por lo que su uso para el diagnóstico de cisticercosis viable en cerdos con estas respuestas de EITB debe ser interpretado con cautela y seguir siendo validado en futuros estudios.

Recomendaciones generales

- La combinación de los patrones de bandas de EITB (principalmente de clase 2) con los resultados de Ag-ELISA en humanos mejoran la capacidad de discriminar infección viable en pacientes con NCC que requieren confirmación diagnóstica para el tratamiento antiparasitario. No obstante, la presencia de

falsos negativos de Ag-ELISA principalmente en pacientes con patrones de bandas de clases 3 y 4 (todos correspondientes a infecciones viables con 1 ó 2 cisticercos) sugieren evaluar nuevos formatos de detección que tengan mayor avidez en la detección de antígeno y así mejorar la sensibilidad del Ag-ELISA para el diagnóstico de infecciones viables leves. Asimismo, es importante evaluar la reproducibilidad de nuestros hallazgos en futuras investigaciones. Por otro lado, el uso de métodos cuantitativos de detección de anticuerpos como Luminex en combinación con métodos de detección de antígenos podría mejorar la capacidad diagnóstica de ambos ensayos para discriminar NCC viable.

- Con respecto al estudio de porcinos, la detección de antígeno utilizando el formato actual de Ag-ELISA B158/B60 no permite detectar apropiadamente infección viable, siendo uno de sus principales problemas la reacción cruzada con *T. hydatigena* y con otros posibles cestodos en cerdos que deben ser evaluados en futuros estudios. No obstante, ensayos futuros de detección de antígeno basados en el desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos del cisticerco de *T. solium* podrían corregir el problema de reacción cruzada con cisticercosis por *T. hydatigena*. Asimismo, son necesarios estudios posteriores para validar nuestros hallazgos en poblaciones porcinas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Garcia HH, Nash TE, Del Brutto OH. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Lancet Neurol.* 2014;13(12):1202-15. Epub 2014/12/03. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70094-8. PubMed PMID: 25453460.
2. Gilman RH, Gonzalez AE, Llanos-Zavalaga F, Tsang VC, Garcia HH, Cysticercosis Working Group in P. Prevention and control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in Peru. *Pathog Glob Health.* 2012;106(5):312-8. Epub 2012/12/26. doi: 10.1179/2047773212Y.0000000045. PubMed PMID: 23265557; PubMed Central PMCID: PMC4005116.
3. Coyle CM, Mahanty S, Zunt JR, Wallin MT, Cantey PT, White AC, Jr., et al. Neurocysticercosis: neglected but not forgotten. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(5):e1500. Epub 2012/06/06. doi: 10.1371/journal.pntd.0001500. PubMed PMID: 22666505; PubMed Central PMCID: PMC3362619.
4. Pawlowski Z. *Taenia solium*: basic biology and transmission. In: Singh G, Prabhakar, S, editor. *Taenia solium* cysticercosis: from basic to clinical science. 1st Edition: CABI Publishing; 2002.
5. Ng-Nguyen D, Stevenson MA, Breen K, Phan TV, Nguyen VT, Vo TV, et al. The epidemiology of *Taenia* spp. infection and *Taenia solium* cysticerci exposure in humans in the Central Highlands of Vietnam. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):527. Epub 2018/10/24. doi: 10.1186/s12879-018-3434-9. PubMed PMID: 30348095; PubMed Central PMCID: PMC6198533.
6. Pray IW, Swanson DJ, Ayvar V, Muro C, Moyano LM, Gonzalez AE, et al. GPS Tracking of Free-Ranging Pigs to Evaluate Ring Strategies for the Control of Cysticercosis/Taeniasis in Peru. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(4):e0004591. Epub

2016/04/02. doi: 10.1371/journal.pntd.0004591. PubMed PMID: 27035825; PubMed Central PMCID: PMC4818035.

7. Verastegui M, Gilman RH, Arana Y, Barber D, Velasquez J, Farfan M, et al. *Taenia solium* oncosphere adhesion to intestinal epithelial and Chinese hamster ovary cells in vitro. *Infect Immun*. 2007;75(11):5158-66. Epub 2007/08/19. doi: 10.1128/IAI.01175-06. PubMed PMID: 17698575; PubMed Central PMCID: PMC2168301.

8. Chile N, Clark T, Arana Y, Ortega YR, Palma S, Mejia A, et al. In Vitro Study of *Taenia solium* Postoncospherical Form. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(2):e0004396. Epub 2016/02/11. doi: 10.1371/journal.pntd.0004396. PubMed PMID: 26863440; PubMed Central PMCID: PMC4749246.

9. Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH. *Taenia solium* Cysticercosis and Its Impact in Neurological Disease. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(3). Epub 2020/05/29. doi: 10.1128/CMR.00085-19. PubMed PMID: 32461308; PubMed Central PMCID: PMC7254859.

10. Debacq G, Moyano LM, Garcia HH, Boumediene F, Marin B, Ngoungou EB, et al. Systematic review and meta-analysis estimating association of cysticercosis and neurocysticercosis with epilepsy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(3):e0005153. Epub 2017/03/08. doi: 10.1371/journal.pntd.0005153. PubMed PMID: 28267746; PubMed Central PMCID: PMC5340353.

11. Lightowers MW, Donadeu M. Designing a Minimal Intervention Strategy to Control *Taenia solium*. *Trends Parasitol*. 2017;33(6):426-34. Epub 2017/02/27. doi: 10.1016/j.pt.2017.01.011. PubMed PMID: 28236521.

12. Ngowi HA, Winkler AS, Braae UC, Mdegela RH, Mkupasi EM, Kabululu ML, et al. *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis literature in Tanzania provides research evidence justification for control: A systematic scoping review. *PLoS One*. 2019;14(6):e0217420. Epub 2019/06/06. doi: 10.1371/journal.pone.0217420. PubMed PMID: 31166983; PubMed Central PMCID: PMC6550401.
13. Ito A, Nakao M, Wandra T. Human Taeniasis and cysticercosis in Asia. *Lancet*. 2003;362(9399):1918-20. Epub 2003/12/12. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14965-3. PubMed PMID: 14667751.
14. Subianto DB, Tumada LR, Margono SS. Burns and epileptic fits associated with cysticercosis in mountain people of Irian Jaya. *Trop Geogr Med*. 1978;30(3):275-8. Epub 1978/09/01. PubMed PMID: 734751.
15. Li T, Chen X, Wang H, Openshaw JJ, Zhong B, Felt SA, et al. High prevalence of taeniasis and *Taenia solium* cysticercosis in children in western Sichuan, China. *Acta Trop*. 2019;199:105133. Epub 2019/08/16. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105133. PubMed PMID: 31415736.
16. Ndimubanzi PC, Carabin H, Budke CM, Nguyen H, Qian YJ, Rainwater E, et al. A systematic review of the frequency of neurocysticercosis with a focus on people with epilepsy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(11):e870. Epub 2010/11/13. doi: 10.1371/journal.pntd.0000870. PubMed PMID: 21072231; PubMed Central PMCID: PMC2970544.
17. Dumas M, Grunitzky E, Deniau M, Dabis F, Bouteille B, Belo M, et al. Epidemiological study of neuro-cysticercosis in northern Togo (West Africa). *Acta Leiden*. 1989;57(2):191-6. Epub 1989/01/01. PubMed PMID: 2488997.

18. Edia-Asuke AU, Inabo HI, Mukaratirwa S, Umoh VJ, Whong CM, Asuke S, et al. Seroprevalence of human cysticercosis and its associated risk factors among humans in areas of Kaduna metropolis, Nigeria. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9(8):799-805. Epub 2015/09/01. doi: 10.3855/jidc.5415. PubMed PMID: 26322870.
19. Melki J, Koffi E, Boka M, Toure A, Soumahoro MK, Jambou R. *Taenia solium* cysticercosis in West Africa: status update. *Parasite*. 2018;25:49. Epub 2018/09/20. doi: 10.1051/parasite/2018048. PubMed PMID: 30230445; PubMed Central PMCID: PMC6144651.
20. Mwape KE, Blocher J, Wiefek J, Schmidt K, Dorny P, Praet N, et al. Prevalence of Neurocysticercosis in People with Epilepsy in the Eastern Province of Zambia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(8):e0003972. Epub 2015/08/19. doi: 10.1371/journal.pntd.0003972. PubMed PMID: 26285031; PubMed Central PMCID: PMC4540454.
21. Winkler AS, Blocher J, Auer H, Gotwald T, Matuja W, Schmutzhard E. Epilepsy and neurocysticercosis in rural Tanzania-An imaging study. *Epilepsia*. 2009;50(5):987-93. Epub 2008/12/05. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01867.x. PubMed PMID: 19054402.
22. Coral-Almeida M, Gabriel S, Abatih EN, Praet N, Benitez W, Dorny P. *Taenia solium* Human Cysticercosis: A Systematic Review of Sero-epidemiological Data from Endemic Zones around the World. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(7):e0003919. Epub 2015/07/07. doi: 10.1371/journal.pntd.0003919. PubMed PMID: 26147942; PubMed Central PMCID: PMC4493064.

23. Singh BB, Khatkar MS, Gill JP, Dhand NK. Estimation of the health and economic burden of neurocysticercosis in India. *Acta Trop.* 2017;165:161-9. Epub 2016/01/24. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.01.017. PubMed PMID: 26802489.
24. O'Neal SE, Flecker RH. Hospitalization frequency and charges for neurocysticercosis, United States, 2003-2012. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(6):969-76. Epub 2015/05/20. doi: 10.3201/eid2106.141324. PubMed PMID: 25988221; PubMed Central PMCID: PMC4451927.
25. Serpa JA, White AC, Jr. Neurocysticercosis in the United States. *Pathog Glob Health.* 2012;106(5):256-60. Epub 2012/12/26. doi: 10.1179/2047773212Y.0000000028. PubMed PMID: 23265549; PubMed Central PMCID: PMC4005108.
26. Schantz PM, Moore AC, Munoz JL, Hartman BJ, Schaefer JA, Aron AM, et al. Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish community in New York City. *The New England journal of medicine.* 1992;327(10):692-5. Epub 1992/09/03. doi: 10.1056/NEJM199209033271004. PubMed PMID: 1495521.
27. Fabiani S, Bruschi F. Neurocysticercosis in Europe: Still a public health concern not only for imported cases. *Acta Trop.* 2013;128(1):18-26. Epub 2013/07/23. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.06.020. PubMed PMID: 23871891.
28. Bruno E, Bartoloni A, Zammarchi L, Strohmeyer M, Bartalesi F, Bustos JA, et al. Epilepsy and neurocysticercosis in Latin America: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(10):e2480. Epub 2013/11/10. doi: 10.1371/journal.pntd.0002480. PubMed PMID: 24205415; PubMed Central PMCID: PMC4381434.

29. Garcia-Noval J, Moreno E, de Mata F, Soto de Alfaro H, Fletes C, Craig PS, et al. An epidemiological study of epilepsy and epileptic seizures in two rural Guatemalan communities. *Ann Trop Med Parasitol*. 2001;95(2):167-75. Epub 2001/04/12. doi: 10.1080/00034980120050260. PubMed PMID: 11299123.
30. Cruz ME, Schantz PM, Cruz I, Espinosa P, Preux PM, Cruz A, et al. Epilepsy and neurocysticercosis in an Andean community. *Int J Epidemiol*. 1999;28(4):799-803. Epub 1999/09/10. doi: 10.1093/ije/28.4.799. PubMed PMID: 10480714.
31. Schantz PM, Sarti E, Plancarte A, Wilson M, Criales JL, Roberts J, et al. Community-based epidemiological investigations of cysticercosis due to *Taenia solium*: comparison of serological screening tests and clinical findings in two populations in Mexico. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1994;18(6):879-85. Epub 1994/06/01. doi: 10.1093/clinids/18.6.879. PubMed PMID: 8086547.
32. Del Brutto OH, Arroyo G, Del Brutto VJ, Zambrano M, Garcia HH. On the relationship between calcified neurocysticercosis and epilepsy in an endemic village: A large-scale, computed tomography-based population study in rural Ecuador. *Epilepsia*. 2017;58(11):1955-61. Epub 2017/08/30. doi: 10.1111/epi.13892. PubMed PMID: 28850668; PubMed Central PMCID: PMC5670011.
33. Diaz F, Garcia HH, Gilman RH, Gonzales AE, Castro M, Tsang VC, et al. Epidemiology of taeniasis and cysticercosis in a Peruvian village. The Cysticercosis Working Group in Peru. *Am J Epidemiol*. 1992;135(8):875-82. Epub 1992/04/15. PubMed PMID: 1585900; PubMed Central PMCID: PMC3103216.

34. Garcia HH, Martinez M, Gilman R, Herrera G, Tsang VC, Pilcher JB, et al. Diagnosis of cysticercosis in endemic regions. The Cysticercosis Working Group in Peru. *Lancet*. 1991;338(8766):549-51. Epub 1991/08/31. PubMed PMID: 1678809; PubMed Central PMCID: PMCPMC2913119.
35. Garcia HH, Gilman R, Martinez M, Tsang VC, Pilcher JB, Herrera G, et al. Cysticercosis as a major cause of epilepsy in Peru. The Cysticercosis Working Group in Peru (CWG). *Lancet*. 1993;341(8839):197-200. Epub 1993/01/23. doi: 10.1016/0140-6736(93)90064-n. PubMed PMID: 8093496; PubMed Central PMCID: PMCPMC2917763.
36. Garcia HH, Gilman RH, Gonzalez AE, Verastegui M, Rodriguez S, Gavidia C, et al. Hyperendemic human and porcine *Taenia solium* infection in Peru. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2003;68(3):268-75. Epub 2003/04/11. PubMed PMID: 12685628.
37. Moyano LM, O'Neal SE, Ayvar V, Gonzalvez G, Gamboa R, Vilchez P, et al. High Prevalence of Asymptomatic Neurocysticercosis in an Endemic Rural Community in Peru. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(12):e0005130. Epub 2016/12/20. doi: 10.1371/journal.pntd.0005130. PubMed PMID: 27992429; PubMed Central PMCID: PMCPMC5167259.
38. Gonzales I, Miranda JJ, Rodriguez S, Vargas V, Cjuno A, Smeeth L, et al. Seizures, cysticercosis and rural-to-urban migration: the PERU MIGRANT study. *Trop Med Int Health*. 2015;20(4):546-52. Epub 2015/01/13. doi: 10.1111/tmi.12456. PubMed PMID: 25581851; PubMed Central PMCID: PMCPMC4355387.

39. Gonzalez AE, Garcia HH, Gilman RH, Tsang VC, Cisticercosis Working Group in P. Control of *Taenia solium*. *Acta Trop*. 2003;87(1):103-9. Epub 2003/06/05. doi: 10.1016/s0001-706x(03)00025-1. PubMed PMID: 12781384.
40. Acha PN, Szyfres B, Acha PNZyetcahala. *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals*. 3rd ed. ed: Washington.
41. Trevisan C, Sotiraki S, Laranjo-Gonzalez M, Dermauw V, Wang Z, Karssin A, et al. Correction to: Epidemiology of taeniosis/cysticercosis in Europe, a systematic review: eastern Europe. *Parasit Vectors*. 2019;12(1):84. Epub 2019/02/20. doi: 10.1186/s13071-019-3328-8. PubMed PMID: 30777134; PubMed Central PMCID: PMC6380047.
42. Laranjo-Gonzalez M, Devleesschauwer B, Trevisan C, Allepuz A, Sotiraki S, Abraham A, et al. Epidemiology of taeniosis/cysticercosis in Europe, a systematic review: Western Europe. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):349. Epub 2017/07/25. doi: 10.1186/s13071-017-2280-8. PubMed PMID: 28732550; PubMed Central PMCID: PMC5521153.
43. The marketing of cysticercotic pigs in the Sierra of Peru. The Cysticercosis Working Group in Peru. *Bull World Health Organ*. 1993;71(2):223-8. Epub 1993/01/01. PubMed PMID: 8490986; PubMed Central PMCID: PMC2393460.
44. Sanchez AL, Medina MT, Ljungstrom I. Prevalence of taeniasis and cysticercosis in a population of urban residence in Honduras. *Acta Trop*. 1998;69(2):141-9. Epub 1998/05/20. doi: 10.1016/s0001-706x(97)00132-0. PubMed PMID: 9588234.

45. Garcia-Noval J, Allan JC, Fletes C, Moreno E, DeMata F, Torres-Alvarez R, et al. Epidemiology of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in two rural Guatemalan communities. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1996;55(3):282-9. Epub 1996/09/01. doi: 10.4269/ajtmh.1996.55.282. PubMed PMID: 8842116.
46. Braae UC, Devleesschauwer B, Sithole F, Wang Z, Willingham AL. Mapping occurrence of *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis and areas at risk of porcine cysticercosis in Central America and the Caribbean basin. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):424. Epub 2017/09/20. doi: 10.1186/s13071-017-2362-7. PubMed PMID: 28923090; PubMed Central PMCID: PMC5604492.
47. Rodriguez-Canul R, Fraser A, Allan JC, Dominguez-Alpizar JL, Argaez-Rodriguez F, Craig PS. Epidemiological study of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in a rural village in Yucatan state, Mexico. *Ann Trop Med Parasitol*. 1999;93(1):57-67. Epub 1999/09/24. doi: 10.1080/00034989958807. PubMed PMID: 10492672.
48. Carrique-Mas J, Iihoshi N, Widdowson MA, Roca Y, Morales G, Quiroga J, et al. An epidemiological study of *Taenia solium* cysticercosis in a rural population in the Bolivian Chaco. *Acta Trop*. 2001;80(3):229-35. Epub 2001/11/09. doi: 10.1016/s0001-706x(01)00161-9. PubMed PMID: 11700180.
49. Jayashi CM, Arroyo G, Lightowers MW, Garcia HH, Rodriguez S, Gonzalez AE. Seroprevalence and risk factors for *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs of northern Peru. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(7):e1733. Epub 2012/07/21. doi: 10.1371/journal.pntd.0001733. PubMed PMID: 22816002; PubMed Central PMCID: PMC3398967.

50. Gonzalez AE, Lopez-Urbina T, Tsang B, Gavidia C, Garcia HH, Silva ME, et al. Transmission dynamics of *Taenia solium* and potential for pig-to-pig transmission. *Parasitol Int.* 2006;55 Suppl:S131-5. Epub 2005/12/15. doi: 10.1016/j.parint.2005.11.021. PubMed PMID: 16352459.
51. O'Neal SE, Moyano LM, Ayvar V, Rodriguez S, Gavidia C, Wilkins PP, et al. Ring-screening to control endemic transmission of *Taenia solium*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(9):e3125. Epub 2014/09/12. doi: 10.1371/journal.pntd.0003125. PubMed PMID: 25210748; PubMed Central PMCID: PMC4161340.
52. Carabin H, Ndimubanzi PC, Budke CM, Nguyen H, Qian Y, Cowan LD, et al. Clinical manifestations associated with neurocysticercosis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(5):e1152. Epub 2011/06/02. doi: 10.1371/journal.pntd.0001152. PubMed PMID: 21629722; PubMed Central PMCID: PMC3101170.
53. Duque KR, Escalaya AL, Zapata W, Burneo JG, Bustos JA, Gonzales I, et al. Clinical topography relationship in patients with parenchymal neurocysticercosis and seizures. *Epilepsy Res.* 2018;145:145-52. Epub 2018/07/15. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2018.06.011. PubMed PMID: 30007239.
54. Nash TE, Mahanty S, Loeb JA, Theodore WH, Friedman A, Sander JW, et al. Neurocysticercosis: A natural human model of epileptogenesis. *Epilepsia.* 2015;56(2):177-83. Epub 2014/12/24. doi: 10.1111/epi.12849. PubMed PMID: 25534640; PubMed Central PMCID: PMC4339305.
55. Nash TE, Bustos JA, Garcia HH, Cysticercosis Working Group in P. Disease Centered Around Calcified *Taenia solium* Granuloma. *Trends Parasitol.*

2017;33(1):65-73. Epub 2016/10/11. doi: 10.1016/j.pt.2016.09.003. PubMed PMID: 27720140; PubMed Central PMCID: PMC5203955.

56. Herrick JA, Maharathi B, Kim JS, Abundis GG, Garg A, Gonzales I, et al. Inflammation is a key risk factor for persistent seizures in neurocysticercosis. *Ann Clin Transl Neurol.* 2018;5(5):630-9. Epub 2018/05/16. doi: 10.1002/acn3.562. PubMed PMID: 29761125; PubMed Central PMCID: PMC5945963.

57. Gonzales I, Rivera JT, Garcia HH, Cysticercosis Working Group in P. Pathogenesis of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis. *Parasite Immunol.* 2016;38(3):136-46. Epub 2016/01/30. doi: 10.1111/pim.12307. PubMed PMID: 26824681.

58. Saavedra H, Gonzales I, Alvarado MA, Porras MA, Vargas V, Cjuno RA, et al. [Neurocysticercosis diagnosis and management in Peru]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2010;27(4):586-91. Epub 2011/02/11. doi: 10.1590/s1726-46342010000400015. PubMed PMID: 21308200.

59. Toledo A, Osorio R, Matus C, Martinez Lopez Y, Ramirez Cruz N, Sciutto E, et al. Human Extraparenchymal Neurocysticercosis: The Control of Inflammation Favors the Host...but Also the Parasite. *Front Immunol.* 2018;9:2652. Epub 2018/12/07. doi: 10.3389/fimmu.2018.02652. PubMed PMID: 30505305; PubMed Central PMCID: PMC6250850.

60. Garcia HH, Del Brutto OH, Cysticercosis Working Group in P. Antiparasitic treatment of neurocysticercosis - The effect of cyst destruction in seizure evolution. *Epilepsy Behav.* 2017;76:158-62. Epub 2017/06/14. doi: 10.1016/j.yebeh.2017.03.013. PubMed PMID: 28606690; PubMed Central PMCID: PMC5675823.

61. Garcia HH, Gonzales I, Lescano AG, Bustos JA, Zimic M, Escalante D, et al. Efficacy of combined antiparasitic therapy with praziquantel and albendazole for neurocysticercosis: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(8):687-95. Epub 2014/07/08. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70779-0. PubMed PMID: 24999157; PubMed Central PMCID: PMC4157934.
62. Del Brutto OH, Nash TE, White AC, Jr., Rajshekhar V, Wilkins PP, Singh G, et al. Revised diagnostic criteria for neurocysticercosis. *J Neurol Sci*. 2017;372:202-10. Epub 2016/12/27. doi: 10.1016/j.jns.2016.11.045. PubMed PMID: 28017213.
63. Garcia HH, Del Brutto OH. Imaging findings in neurocysticercosis. *Acta Trop*. 2003;87(1):71-8. Epub 2003/06/05. PubMed PMID: 12781380.
64. Garcia HH, Herrera G, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, Diaz JF, et al. Discrepancies between cerebral computed tomography and western blot in the diagnosis of neurocysticercosis. The Cysticercosis Working Group in Peru (Clinical Studies Coordination Board). *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1994;50(2):152-7. Epub 1994/02/01. PubMed PMID: 8116806.
65. Garcia HH, Rodriguez S, Gilman RH, Gonzalez AE, Tsang VC, Cysticercosis Working Group in P. Neurocysticercosis: is serology useful in the absence of brain imaging? *Trop Med Int Health*. 2012;17(8):1014-8. Epub 2012/07/20. doi: 10.1111/j.1365-3156.2012.03037.x. PubMed PMID: 22809375.
66. Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis*. 1989;159(1):50-9. Epub 1989/01/01. PubMed PMID: 2909643.

67. Wilson M, Bryan RT, Fried JA, Ware DA, Schantz PM, Pilcher JB, et al. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. *J Infect Dis.* 1991;164(5):1007-9. Epub 1991/11/01. PubMed PMID: 1940452.
68. Garcia HH, Castillo Y, Gonzales I, Bustos JA, Saavedra H, Jacob L, et al. Low sensitivity and frequent cross-reactions in commercially available antibody detection ELISA assays for *Taenia solium* cysticercosis. *Trop Med Int Health.* 2018;23(1):101-5. Epub 2017/11/22. doi: 10.1111/tmi.13010. PubMed PMID: 29160912; PubMed Central PMCID: PMC5760338.
69. Garcia HH, O'Neal SE, Noh J, Handali S, Cysticercosis Working Group in P. Laboratory Diagnosis of Neurocysticercosis (*Taenia solium*). *Journal of clinical microbiology.* 2018;56(9). Epub 2018/06/08. doi: 10.1128/JCM.00424-18. PubMed PMID: 29875195; PubMed Central PMCID: PMC6113464.
70. Harrison LJ, Joshua GW, Wright SH, Parkhouse RM. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunol.* 1989;11(4):351-70. Epub 1989/07/01. doi: 10.1111/j.1365-3024.1989.tb00673.x. PubMed PMID: 2674862.
71. Brandt JR, Geerts S, De Deken R, Kumar V, Ceulemans F, Brijs L, et al. A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. *Int J Parasitol.* 1992;22(4):471-7. Epub 1992/07/01. PubMed PMID: 1644522.
72. Garcia HH, Parkhouse RM, Gilman RH, Montenegro T, Bernal T, Martinez SM, et al. Serum antigen detection in the diagnosis, treatment, and follow-up of

neurocysticercosis patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000;94(6):673-6. Epub 2001/02/24. PubMed PMID: 11198654.

73. Garcia HH, O'Neal SE, Gilman RH, Cysticercosis Working Group in P. Elimination of *Taenia solium* Transmission in Peru. *The New England journal of medicine.* 2016;375(12):1196-7. Epub 2016/09/23. doi: 10.1056/NEJMc1609161. PubMed PMID: 27653579.

74. Gonzalez AE, Cama V, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, Chavera A, et al. Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 1990;43(2):194-9. Epub 1990/08/01. PubMed PMID: 2389823.

75. Chembensofu M, Mwape KE, Van Damme I, Hobbs E, Phiri IK, Masuku M, et al. Re-visiting the detection of porcine cysticercosis based on full carcass dissections of naturally *Taenia solium* infected pigs. *Parasit Vectors.* 2017;10(1):572. Epub 2017/11/18. doi: 10.1186/s13071-017-2520-y. PubMed PMID: 29145875; PubMed Central PMCID: PMC5693468.

76. Pray IW, Ayvar V, Gamboa R, Muro C, Moyano LM, Benavides V, et al. Spatial relationship between *Taenia solium* tapeworm carriers and necropsy cyst burden in pigs. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(4):e0005536. Epub 2017/04/14. doi: 10.1371/journal.pntd.0005536. PubMed PMID: 28406898; PubMed Central PMCID: PMC5404875.

77. Lightowlers MW, Assana E, Jayashi CM, Gauci CG, Donadeu M. Sensitivity of partial carcass dissection for assessment of porcine cysticercosis at necropsy. *Int J Parasitol.* 2015;45(13):815-8. Epub 2015/09/20. doi:

10.1016/j.ijpara.2015.08.004. PubMed PMID: 26385439; PubMed Central PMCID: PMC4655835.

78. Flecker RH, Pray IW, Santivanez SJ, Ayvar V, Gamboa R, Muro C, et al. Assessing Ultrasonography as a Diagnostic Tool for Porcine Cysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(1):e0005282. Epub 2017/01/06. doi: 10.1371/journal.pntd.0005282. PubMed PMID: 28056028; PubMed Central PMCID: PMC5242540.

79. Gonzalez AE, Gilman R, Garcia HH, McDonald J, Kacena K, Tsang VC, et al. Use of sentinel pigs to monitor environmental *Taenia solium* contamination. The Cysticercosis Working Group in Peru (CWG). *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1994;51(6):847-50. Epub 1994/12/01. PubMed PMID: 7810821.

80. Dorny P, Vercammen F, Brandt J, Vansteenkiste W, Berkvens D, Geerts S. Sero-epidemiological study of *Taenia saginata* cysticercosis in Belgian cattle. *Vet Parasitol*. 2000;88(1-2):43-9. Epub 2000/02/19. PubMed PMID: 10681021.

81. Van Kerckhoven I, Vansteenkiste W, Claes M, Geerts S, Brandt J. Improved detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* metacestodes. *Vet Parasitol*. 1998;76(4):269-74. Epub 1998/07/03. doi: 10.1016/s0304-4017(97)00226-4. PubMed PMID: 9650864.

82. Jayashi CM, Gonzalez AE, Castillo Neyra R, Rodriguez S, Garcia HH, Lightowlers MW, et al. Validity of the Enzyme-linked Immuno-electrotransfer Blot (EITB) for naturally acquired porcine cysticercosis. *Vet Parasitol*. 2014;199(1-2):42-9. Epub 2013/11/05. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.10.004. PubMed PMID: 24183647; PubMed Central PMCID: PMC448663.

83. Tsang VC, Pilcher JA, Zhou W, Boyer AE, Kamango-Sollo EI, Rhoads ML, et al. Efficacy of the immunoblot assay for cysticercosis in pigs and modulated expression of distinct IgM/IgG activities to *Taenia solium* antigens in experimental infections. *Vet Immunol Immunopathol.* 1991;29(1-2):69-78. Epub 1991/08/01. PubMed PMID: 1949584.
84. Garcia HH, Gilman RH, Catacora M, Verastegui M, Gonzalez AE, Tsang VC. Serologic evolution of neurocysticercosis patients after antiparasitic therapy. Cysticercosis Working Group in Peru. *J Infect Dis.* 1997;175(2):486-9. Epub 1997/02/01. PubMed PMID: 9203680; PubMed Central PMCID: PMC3025428.
85. Zea-Vera A, Cordova EG, Rodriguez S, Gonzales I, Pretell EJ, Castillo Y, et al. Parasite antigen in serum predicts the presence of viable brain parasites in patients with apparently calcified cysticercosis only. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2013;57(7):e154-9. Epub 2013/06/22. doi: 10.1093/cid/cit422. PubMed PMID: 23788241; PubMed Central PMCID: PMC3765011.
86. Sciutto E, Martinez JJ, Villalobos NM, Hernandez M, Jose MV, Beltran C, et al. Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Vet Parasitol.* 1998;79(4):299-313. Epub 1998/12/01. PubMed PMID: 9831953.
87. Gavidia CM, Verastegui MR, Garcia HH, Lopez-Urbina T, Tsang VC, Pan W, et al. Relationship between serum antibodies and *Taenia solium* larvae burden in pigs raised in field conditions. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(5):e2192. Epub

2013/05/10. doi: 10.1371/journal.pntd.0002192. PubMed PMID: 23658848; PubMed Central PMCID: PMC3642188.

88. Devleesschauwer B, Aryal A, Tharmalingam J, Joshi DD, Rijal S, Speybroeck N, et al. Complexities in using sentinel pigs to study *Taenia solium* transmission dynamics under field conditions. *Vet Parasitol.* 2013;193(1-3):172-8. Epub 2013/01/10. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.12.010. PubMed PMID: 23298565.

89. Gonzalez AE, Verastegui M, Noh JC, Gavidia C, Falcon N, Bernal T, et al. Persistence of passively transferred antibodies in porcine *Taenia solium* cysticercosis. Cysticercosis Working Group in Peru. *Vet Parasitol.* 1999;86(2):113-8. Epub 1999/09/25. doi: 10.1016/s0304-4017(99)00106-5. PubMed PMID: 10496695.

90. Hancock K, Khan A, Williams FB, Yushak ML, Pattabhi S, Noh J, et al. Characterization of the 8-kilodalton antigens of *Taenia solium* metacestodes and evaluation of their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis. *Journal of clinical microbiology.* 2003;41(6):2577-86. Epub 2003/06/07. PubMed PMID: 12791883; PubMed Central PMCID: PMC156563.

91. Hancock K, Pattabhi S, Greene RM, Yushak ML, Williams F, Khan A, et al. Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Mol Biochem Parasitol.* 2004;133(1):115-24. Epub 2003/12/12. doi: 10.1016/j.molbiopara.2003.10.001. PubMed PMID: 14668018.

92. Hancock K, Pattabhi S, Whitfield FW, Yushak ML, Lane WS, Garcia HH, et al. Characterization and cloning of T24, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;147(1):109-17. Epub 2006/03/17. doi: 10.1016/j.molbiopara.2006.02.004. PubMed PMID: 16540186.

93. Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J.* 1997;11(6):428-42. Epub 1997/05/01. PubMed PMID: 9194523.
94. Arroyo G, Rodriguez S, Lescano AG, Alroy KA, Bustos JA, Santivanez S, et al. Antibody Banding Patterns of the Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot and Brain Imaging Findings in Patients With Neurocysticercosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2018;66(2):282-8. Epub 2017/10/12. doi: 10.1093/cid/cix774. PubMed PMID: 29020381; PubMed Central PMCID: PMC5850523.
95. Rodriguez S, Dorny P, Tsang VC, Pretell EJ, Brandt J, Lescano AG, et al. Detection of *Taenia solium* antigens and anti-*T. solium* antibodies in paired serum and cerebrospinal fluid samples from patients with intraparenchymal or extraparenchymal neurocysticercosis. *J Infect Dis.* 2009;199(9):1345-52. Epub 2009/04/11. doi: 10.1086/597757. PubMed PMID: 19358669; PubMed Central PMCID: PMC4059603.
96. Bustos JA, Ninaquispe BE, Rodriguez S, Castillo Y, Yang SY, Gilman RH, et al. Performance of a Sandwich Antigen-Detection ELISA for the Diagnosis of Porcine *Taenia solium* Cysticercosis. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2019;100(3):604-8. Epub 2019/01/18. doi: 10.4269/ajtmh.18-0697. PubMed PMID: 30652670; PubMed Central PMCID: PMC6402926.
97. Deckers N, Kanobana K, Silva M, Gonzalez AE, Garcia HH, Gilman RH, et al. Serological responses in porcine cysticercosis: a link with the parasitological outcome of infection. *Int J Parasitol.* 2008;38(10):1191-8. Epub 2008/03/11. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.01.005. PubMed PMID: 18328486.

98. Gonzalez AE, Bustos JA, Garcia HH, Rodriguez S, Zimic M, Castillo Y, et al. Successful Antiparasitic Treatment for Cysticercosis is Associated with a Fast and Marked Reduction of Circulating Antigen Levels in a Naturally Infected Pig Model. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2015;93(6):1305-10. Epub 2015/09/24. doi: 10.4269/ajtmh.15-0370. PubMed PMID: 26392159; PubMed Central PMCID: PMC4674250.
99. Bustos JA, Arroyo G, Gilman RH, Soto-Becerra P, Gonzales I, Saavedra H, et al. Frequency and determinant factors for calcification in neurocysticercosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2020. Epub 2020/06/20. doi: 10.1093/cid/ciaa784. PubMed PMID: 32556276.
100. Nash T. Edema surrounding calcified intracranial cysticerci: clinical manifestations, natural history, and treatment. *Pathog Glob Health*. 2012;106(5):275-9. Epub 2012/12/26. doi: 10.1179/2047773212Y.0000000026. PubMed PMID: 23265551; PubMed Central PMCID: PMC4005110.
101. Garcia HH, Pretell EJ, Gilman RH, Martinez SM, Moulton LH, Del Brutto OH, et al. A trial of antiparasitic treatment to reduce the rate of seizures due to cerebral cysticercosis. *The New England journal of medicine*. 2004;350(3):249-58. Epub 2004/01/16. doi: 10.1056/NEJMoa031294. PubMed PMID: 14724304.
102. Lescano AG, Pray IW, Gonzalez AE, Gilman RH, Tsang VCW, Gamboa R, et al. Clustering of Necropsy-Confirmed Porcine Cysticercosis Surrounding *Taenia solium* Tapeworm Carriers in Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2019;100(2):314-22. Epub 2018/12/19. doi: 10.4269/ajtmh.18-0296. PubMed PMID: 30560769; PubMed Central PMCID: PMC6367604.

103. Vigre H, Ersboll AK, Sorensen V. Decay of acquired colostral antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2003;50(9):430-5. Epub 2003/11/25. doi: 10.1046/j.0931-1793.2003.00700.x. PubMed PMID: 14633196.
104. Garcia HH, Cysticercosis Working Group in P. Neurocysticercosis in immigrant populations. *J Travel Med*. 2012;19(2):73-5. Epub 2012/03/15. doi: 10.1111/j.1708-8305.2011.00583.x. PubMed PMID: 22414030; PubMed Central PMCID: PMC3349430.
105. Nii-Trebi NI. Emerging and Neglected Infectious Diseases: Insights, Advances, and Challenges. *Biomed Res Int*. 2017;2017:5245021. Epub 2017/03/14. doi: 10.1155/2017/5245021. PubMed PMID: 28286767; PubMed Central PMCID: PMC5327784 publication of this paper.
106. Torgerson PR, Macpherson CN. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: global trends. *Vet Parasitol*. 2011;182(1):79-95. Epub 2011/08/25. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.07.017. PubMed PMID: 21862222.
107. Takayanagui OM, Odashima NS. Clinical aspects of neurocysticercosis. *Parasitol Int*. 2006;55 Suppl:S111-5. Epub 2005/12/07. doi: 10.1016/j.parint.2005.11.016. PubMed PMID: 16330240.
108. Nash TE, Bartelt LA, Korpe PS, Lopes B, Houpt ER. Calcified neurocysticercus, perilesional edema, and histologic inflammation. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2014;90(2):318-21. Epub 2014/01/08. doi: 10.4269/ajtmh.13-0589. PubMed PMID: 24394477; PubMed Central PMCID: PMC3919241.

109. del Brutto OH. [Neurocysticercosis in children: clinical and radiological analysis and prognostic factors in 54 patients]. *Rev Neurol.* 1997;25(147):1681-4. Epub 1998/03/04. PubMed PMID: 9484517.
110. Teitelbaum GP, Otto RJ, Lin M, Watanabe AT, Stull MA, Manz HJ, et al. MR imaging of neurocysticercosis. *AJR Am J Roentgenol.* 1989;153(4):857-66. Epub 1989/10/01. doi: 10.2214/ajr.153.4.857. PubMed PMID: 2773743.
111. Martinez HR, Rangel-Guerra R, Elizondo G, Gonzalez J, Todd LE, Ancer J, et al. MR imaging in neurocysticercosis: a study of 56 cases. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1989;10(5):1011-9. Epub 1989/09/01. PubMed PMID: 2505513.
112. Del Brutto OH. Neurocysticercosis. *Neurohospitalist.* 2014;4(4):205-12. Epub 2014/11/02. doi: 10.1177/1941874414533351. PubMed PMID: 25360206; PubMed Central PMCID: PMC4212415.
113. RStudio: Integrated Development for R PBC, Boston, MA: RStudio; 2015. Available from: <http://www.rstudio.com/>.
114. Furrows SJ, McCroddan J, Bligh WJ, Chiodini P. Lack of specificity of a single positive 50-kDa band in the electroimmunotransfer blot (EITB) assay for cysticercosis. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2006;12(5):459-62. Epub 2006/04/29. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01381.x. PubMed PMID: 16643523.
115. Garcia HH, Gonzalez AE, Tsang VC, O'Neal SE, Llanos-Zavalaga F, Gonzalvez G, et al. Elimination of *Taenia solium* Transmission in Northern Peru. *The New England journal of medicine.* 2016;374(24):2335-44. Epub 2016/06/16.

doi: 10.1056/NEJMoa1515520. PubMed PMID: 27305193; PubMed Central PMCID: PMC4962610.

116. Muro C, Gomez-Puerta LA, Flecker RH, Gamboa R, Barreto PV, Dorny P, et al. Porcine Cysticercosis: Possible Cross-Reactivity of *Taenia hydatigena* to GP50 Antigen in the Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot Assay. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2017;97(6):1830-2. Epub 2017/10/11. doi: 10.4269/ajtmh.17-0378. PubMed PMID: 29016332; PubMed Central PMCID: PMC5805061.

117. Gomez-Puerta L, Vargas-Calla A, Castillo Y, Lopez-Urbina MT, Dorny P, Garcia HH, et al. Evaluation of cross-reactivity to *Taenia hydatigena* and *Echinococcus granulosus* in the enzyme-linked immunoelctrotransfer blot assay for the diagnosis of porcine cysticercosis. Parasit Vectors. 2019;12(1):57. Epub 2019/01/27. doi: 10.1186/s13071-018-3279-5. PubMed PMID: 30678700; PubMed Central PMCID: PMC6346519.

118. Pray IW, Muro C, Gamboa R, Vilchez P, Wakeland W, Pan W, et al. Seasonal patterns in risk factors for *Taenia solium* transmission: a GPS tracking study of pigs and open human defecation in northern Peru. Parasit Vectors. 2019;12(1):352. Epub 2019/07/18. doi: 10.1186/s13071-019-3614-5. PubMed PMID: 31311596; PubMed Central PMCID: PMC6636017.

119. Arroyo G, Bustos JA, Lescano AG, Gonzales I, Saavedra H, Rodriguez S, et al. Albendazole sulfoxide plasma levels and efficacy of antiparasitic treatment in patients with parenchymal neurocysticercosis. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2019. Epub 2019/02/05. doi: 10.1093/cid/ciz085. PubMed PMID: 30715265.

120. Arroyo G, Toribio L, Vargas-Calla A, Calcina JF, Bernal E, Chile N, et al. Porcine model of neurocysticercosis by intracarotid injection of *Taenia solium* oncospheres: Dose assessment, infection outcomes and serological responses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022;16(6):e0010449. Epub 2022/06/03. doi: 10.1371/journal.pntd.0010449. PubMed PMID: 35653367; PubMed Central PMCID: PMCPMC9162370.
121. Kabululu ML, Johansen MV, Mlangwa JED, Mkupasi EM, Braae UC, Trevisan C, et al. Performance of Ag-ELISA in the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in naturally infected pigs in Tanzania. *Parasit Vectors*. 2020;13(1):534. Epub 2020/10/29. doi: 10.1186/s13071-020-04416-4. PubMed PMID: 33109255; PubMed Central PMCID: PMCPMC7590492.

ANEXOS

ANEXO 1: Análisis de clases latentes – Estudio 1

```
###Ubicar el directorio de trabajo
setwd("/Volumes/GF_USB2/Analisis_tesis")

###Importar la base de datos
study1<-read.csv("data_LCA_study1.csv")

###Recodificar la variable "Patrones de bandas"
study1$EITB_pattern<-factor(study1$EITB_pattern,
levels=c(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17),
labels=c("0000000","0110000","1000000","1010000","1100000","1110000","1110001","
1110010","1110011","1110101","1110111","1111001","1111011","1111100","1111101"
,"1111110","1111111"))

###Descargar comando para LCA
library(poLCA)

## Loading required package: scatterplot3d

## Loading required package: MASS

###Crear modelo de 2 clases
M2<-poLCA(cbind(b1, b2, b3, b4, b5, b6, b7)~1, maxiter=50000, nclass=2, nrep=10,
data=study1)

## Model 1: llik = -570.4455 ... best llik = -570.4455
## Model 2: llik = -570.4455 ... best llik = -570.4455
## Model 3: llik = -570.4455 ... best llik = -570.4455
## Model 4: llik = -570.4455 ... best llik = -570.4455
## Model 5: llik = -570.4455 ... best llik = -570.4455
## Model 6: llik = -570.4455 ... best llik = -570.4455
## Model 7: llik = -570.4455 ... best llik = -570.4455
## Model 8: llik = -570.4455 ... best llik = -570.4455
## Model 9: llik = -570.4455 ... best llik = -570.4455
## Model 10: llik = -570.4455 ... best llik = -570.4455
## Conditional item response (column) probabilities,
## by outcome variable, for each class (row)
##
## $b1
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.0000 1.0000
## class 2: 0.3541 0.6459
##
## $b2
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.0000 1.0000
## class 2: 0.3376 0.6624
##
## $b3
```

```

##          Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.0000 1.0000
## class 2: 0.3541 0.6459
##
## $b4
##          Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.1464 0.8536
## class 2: 1.0000 0.0000
##
## $b5
##          Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.1572 0.8428
## class 2: 1.0000 0.0000
##
## $b6
##          Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.1175 0.8825
## class 2: 0.9644 0.0356
##
## $b7
##          Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.0468 0.9532
## class 2: 0.8701 0.1299
##
## Estimated class population shares
## 0.4325 0.5675
##
## Predicted class memberships (by modal posterior prob.)
## 0.4299 0.5701
##
## =====
## Fit for 2 latent classes:
## =====
## number of observations: 214
## number of estimated parameters: 15
## residual degrees of freedom: 112
## maximum log-likelihood: -570.4455
##
## AIC(2): 1170.891
## BIC(2): 1221.381
## G^2(2): 237.0246 (Likelihood ratio/deviance statistic)
## X^2(2): 308.613 (Chi-square goodness of fit)
##

###Distribución de patrones de bandas de EITB según clases
M2$predclass

## [1] 1 2 2 2 1 2 2 2 1 2 2 2 1 1 2 2 1 2 2 2 1 2 2 1 1 2 2 1 1 2 1 1 1 1 1 2
## [38] 2 1 1 1 2 2 2 2 2 2 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 1 2 1 1 1 2 1 2 2 1 1 2 1 2 2 2
## [75] 2 2 1 2 2 1 2 1 1 1 2 2 1 2 1 2 2 1 2 2 1 2 1 2 2 1 2 1 1 1 2 2 2 2 1 1 1
## [112] 2 2 1 1 1 2 1 2 1 2 1 2 1 1 1 2 1 1 2 2 2 2 1 2 2 2 2 1 2 1 2 2 2 2 2 1 1
## [149] 1 1 2 1 2 2 1 1 2 1 1 2 2 2 1 1 1 2 2 2 2 1 2 2 2 2 2 2 1 2 1 1 2 2 2 2 1
## [186] 1 1 2 2 2 1 2 2 1 1 1 2 1 1 2 2 1 2 2 1 2 2 1 1 2 1 2 1 2

```

```

table(study1$EITB_pattern, M2$predclass)

##
##      1 2
## 0000000 0 31
## 0110000 0 12
## 1000000 0 9
## 1010000 0 1
## 1100000 0 3
## 1110000 0 46
## 1110001 0 16
## 1110010 0 4
## 1110011 8 0
## 1110101 3 0
## 1110111 2 0
## 1111001 3 0
## 1111011 3 0
## 1111100 1 0
## 1111101 3 0
## 1111110 3 0
## 1111111 66 0

###Crear modelo de 3 clases
M3<-poLCA(cbind(b1, b2, b3, b4, b5, b6, b7)~1, maxiter=50000, nclass=3, nrep=10,
data=study1)

## Model 1: llik = -472.554 ... best llik = -472.554
## Model 2: llik = -472.554 ... best llik = -472.554
## Model 3: llik = -472.554 ... best llik = -472.554
## Model 4: llik = -472.554 ... best llik = -472.554
## Model 5: llik = -472.554 ... best llik = -472.554
## Model 6: llik = -472.554 ... best llik = -472.554
## Model 7: llik = -472.554 ... best llik = -472.554
## Model 8: llik = -472.554 ... best llik = -472.554
## Model 9: llik = -472.554 ... best llik = -472.554
## Model 10: llik = -472.554 ... best llik = -472.554
## Conditional item response (column) probabilities,
## by outcome variable, for each class (row)
##
## $b1
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.7754 0.2246
## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 0.1356 0.8644
##
## $b2
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 1.0000 0.0000
## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 0.0116 0.9884
##
## $b3
##      Pr(1) Pr(2)

```

```

## class 1: 1.0000 0.0000
## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 0.0342 0.9658
##
## $b4
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 1.0000 0.0000
## class 2: 0.0761 0.9239
## class 3: 1.0000 0.0000
##
## $b5
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 1.0000 0.0000
## class 2: 0.0878 0.9122
## class 3: 1.0000 0.0000
##
## $b6
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 1.0000 0.0000
## class 2: 0.1177 0.8823
## class 3: 0.8807 0.1193
##
## $b7
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 1.0000 0.0000
## class 2: 0.0470 0.9530
## class 3: 0.7457 0.2543
##
## Estimated class population shares
## 0.1868 0.3995 0.4136
##
## Predicted class memberships (by modal posterior prob.)
## 0.1869 0.3925 0.4206
##
## =====
## Fit for 3 latent classes:
## =====
## number of observations: 214
## number of estimated parameters: 23
## residual degrees of freedom: 104
## maximum log-likelihood: -472.554
##
## AIC(3): 991.1079
## BIC(3): 1068.525
## G^2(3): 41.24152 (Likelihood ratio/deviance statistic)
## X^2(3): 44.06191 (Chi-square goodness of fit)
##
###Distribución de patrones de bandas de EITB según clases
M3$predclass

## [1] 2 1 1 1 2 1 1 3 2 3 3 3 2 2 3 3 2 3 1 3 2 1 1 2 2 3 3 2 2 1 2 2 2 2 2 3
## [38] 3 2 3 2 3 3 3 1 3 1 2 2 3 3 3 3 1 1 3 1 3 2 3 2 2 3 3 3 3 3 2 3 1 3 3 3 3

```

```

## [75] 3 3 2 3 1 2 3 2 2 2 3 1 2 1 2 3 3 2 1 3 2 3 2 3 3 2 3 2 2 2 1 3 3 3 2 2 2
## [112] 3 3 2 2 2 3 2 1 2 3 2 3 3 2 2 3 2 2 1 3 1 1 2 3 3 1 1 2 3 2 3 3 3 3 2 2
## [149] 2 2 1 3 1 3 2 2 3 2 2 3 3 3 2 2 2 3 3 1 3 3 3 1 3 1 3 1 2 1 2 2 1 3 3 3 2
## [186] 2 2 1 3 1 2 3 3 2 2 2 3 2 2 1 1 2 1 3 2 3 3 2 2 3 2 1 2 3

table(study1$EITB_pattern, M3$predclass)

##
##      1 2 3
## 0000000 31 0 0
## 0110000 0 0 12
## 1000000 9 0 0
## 1010000 0 0 1
## 1100000 0 0 3
## 1110000 0 0 46
## 1110001 0 0 16
## 1110010 0 0 4
## 1110011 0 0 8
## 1110101 0 3 0
## 1110111 0 2 0
## 1111001 0 3 0
## 1111011 0 3 0
## 1111100 0 1 0
## 1111101 0 3 0
## 1111110 0 3 0
## 1111111 0 66 0

###Crear modelo de 4 clases
M4<-poLCA(cbind(b1, b2, b3, b4, b5, b6, b7)~1, maxiter=50000, nclass=4, nrep=10,
data=study1)

## Model 1: llik = -455.0639 ... best llik = -455.0639
## Model 2: llik = -455.0639 ... best llik = -455.0639
## Model 3: llik = -455.0639 ... best llik = -455.0639
## Model 4: llik = -455.0639 ... best llik = -455.0639
## Model 5: llik = -455.0639 ... best llik = -455.0639
## Model 6: llik = -455.0639 ... best llik = -455.0639
## Model 7: llik = -455.0639 ... best llik = -455.0639
## Model 8: llik = -455.0639 ... best llik = -455.0639
## Model 9: llik = -455.0639 ... best llik = -455.0639
## Model 10: llik = -456.2989 ... best llik = -455.0639
## Conditional item response (column) probabilities,
## by outcome variable, for each class (row)
##
## $b1
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.1818 0.8182
## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 0.7757 0.2243
## class 4: 0.0000 1.0000
##
## $b2
##      Pr(1) Pr(2)

```

```

## class 1: 0.0158 0.9842
## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 1.0000 0.0000
## class 4: 0.0000 1.0000
##
## $b3
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.0461 0.9539
## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 1.0000 0.0000
## class 4: 0.0000 1.0000
##
## $b4
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 1.0000 0.0000
## class 2: 0.8464 0.1536
## class 3: 1.0000 0.0000
## class 4: 0.0058 0.9942
##
## $b5
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 1.0000 0.0000
## class 2: 0.8440 0.1560
## class 3: 1.0000 0.0000
## class 4: 0.0203 0.9797
##
## $b6
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.9394 0.0000
## class 2: 0.6611 0.3389
## class 3: 1.0000 0.0000
## class 4: 0.0496 0.9504
##
## $b7
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 1.0000 0.0000
## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 1.0000 0.0000
## class 4: 0.0539 0.9461
##
## Estimated class population shares
## 0.3086 0.1577 0.1867 0.3469
##
## Predicted class memberships (by modal posterior prob.)
## 0.3084 0.1636 0.1869 0.3411
##
## =====
## Fit for 4 latent classes:
## =====
## number of observations: 214
## number of estimated parameters: 31
## residual degrees of freedom: 96
## maximum log-likelihood: -455.0639

```

```

##
## AIC(4): 972.1278
## BIC(4): 1076.473
## G^2(4): 6.261403 (Likelihood ratio/deviance statistic)
## X^2(4): 6.268578 (Chi-square goodness of fit)
##

###Distribución de patrones de bandas de EITB según clases
M4$predclass

## [1] 4 3 3 3 4 3 3 1 2 2 2 2 4 4 1 1 4 1 3 1 4 3 3 4 4 1 2 4 4 3 2 2 4 2 2 4 1
## [38] 1 4 2 4 2 1 1 3 1 3 4 4 1 1 1 1 3 3 1 3 1 4 1 4 4 2 2 2 1 1 4 2 3 2 2 1 1
## [75] 1 1 4 2 3 4 1 4 4 4 2 3 4 3 4 1 1 4 3 1 4 1 4 1 1 4 1 4 4 2 3 1 1 1 4 4 4
## [112] 1 1 4 4 4 1 4 3 4 1 4 1 2 4 4 2 4 4 3 1 3 3 4 1 1 3 3 4 1 4 1 1 2 1 1 4 2
## [149] 4 4 3 2 3 1 4 4 2 4 4 1 2 1 4 4 4 1 1 3 1 2 1 3 1 3 2 3 4 3 4 4 3 1 1 1 2
## [186] 4 4 3 1 3 4 2 1 4 4 4 1 4 2 3 3 4 3 1 2 1 1 4 2 1 4 3 4 2

table(study1$EITB_pattern, M4$predclass)

##
##      1 2 3 4
## 0000000 0 0 31 0
## 0110000 12 0 0 0
## 1000000 0 0 9 0
## 1010000 1 0 0 0
## 1100000 3 0 0 0
## 1110000 46 0 0 0
## 1110001 0 16 0 0
## 1110010 0 4 0 0
## 1110011 0 8 0 0
## 1110101 0 3 0 0
## 1110111 0 2 0 0
## 1111001 0 3 0 0
## 1111011 0 3 0 0
## 1111100 0 0 0 1
## 1111101 0 0 0 3
## 1111110 0 0 0 3
## 1111111 0 0 0 66

###Crear modelo de 5 clases
M5<-poLCA(cbind(b1, b2, b3, b4, b5, b6, b7)~1, maxiter=50000, nclass=5, nrep=10,
data=study1)

## Model 1: llik = -453.972 ... best llik = -453.972
## Model 2: llik = -453.972 ... best llik = -453.972
## Model 3: llik = -453.9774 ... best llik = -453.972
## Model 4: llik = -455.0639 ... best llik = -453.972
## Model 5: llik = -453.4037 ... best llik = -453.4037
## Model 6: llik = -453.9774 ... best llik = -453.4037
## Model 7: llik = -455.0639 ... best llik = -453.4037
## Model 8: llik = -455.0639 ... best llik = -453.4037
## Model 9: llik = -453.972 ... best llik = -453.4037
## Model 10: llik = -453.9183 ... best llik = -453.4037
## Conditional item response (column) probabilities,

```

```
## by outcome variable, for each class (row)
```

```
##
```

```
## $b1
```

```
##      Pr(1) Pr(2)
```

```
## class 1: 0.0000 1.0000
```

```
## class 2: 0.0000 1.0000
```

```
## class 3: 1.0000 0.0000
```

```
## class 4: 0.7761 0.2239
```

```
## class 5: 0.0000 1.0000
```

```
##
```

```
## $b2
```

```
##      Pr(1) Pr(2)
```

```
## class 1: 0.0000 1.0000
```

```
## class 2: 0.0195 0.9805
```

```
## class 3: 0.0000 1.0000
```

```
## class 4: 1.0000 0.0000
```

```
## class 5: 0.0000 1.0000
```

```
##
```

```
## $b3
```

```
##      Pr(1) Pr(2)
```

```
## class 1: 0.0000 1.0000
```

```
## class 2: 0.0565 0.9435
```

```
## class 3: 0.0000 1.0000
```

```
## class 4: 1.0000 0.0000
```

```
## class 5: 0.0000 1.0000
```

```
##
```

```
## $b4
```

```
##      Pr(1) Pr(2)
```

```
## class 1: 0.0058 0.9942
```

```
## class 2: 1.0000 0.0000
```

```
## class 3: 1.0000 0.0000
```

```
## class 4: 1.0000 0.0000
```

```
## class 5: 0.8464 0.1536
```

```
##
```

```
## $b5
```

```
##      Pr(1) Pr(2)
```

```
## class 1: 0.0203 0.9797
```

```
## class 2: 1.0000 0.0000
```

```
## class 3: 1.0000 0.0000
```

```
## class 4: 1.0000 0.0000
```

```
## class 5: 0.8440 0.1560
```

```
##
```

```
## $b6
```

```
##      Pr(1) Pr(2)
```

```
## class 1: 0.0496 0.9504
```

```
## class 2: 0.9260 0.0740
```

```
## class 3: 1.0000 0.0000
```

```
## class 4: 1.0000 0.0000
```

```
## class 5: 0.6611 0.3389
```

```
##
```

```
## $b7
```

```
##      Pr(1) Pr(2)
```

```
## class 1: 0.0539 0.9461
```

```

## class 2: 1.0000 0.0000
## class 3: 1.0000 0.0000
## class 4: 1.0000 0.0000
## class 5: 0.0000 1.0000
##
## Estimated class population shares
## 0.3469 0.2526 0.0561 0.1867 0.1578
##
## Predicted class memberships (by modal posterior prob.)
## 0.3411 0.2523 0.0561 0.1869 0.1636
##
## =====
## Fit for 5 latent classes:
## =====
## number of observations: 214
## number of estimated parameters: 39
## residual degrees of freedom: 88
## maximum log-likelihood: -453.4037
##
## AIC(5): 984.8074
## BIC(5): 1116.08
## G^2(5): 2.941033 (Likelihood ratio/deviance statistic)
## X^2(5): 4.203152 (Chi-square goodness of fit)
##

###Distribución de patrones de bandas de EITB según clases
M5$predclass

## [1] 1 4 4 4 1 4 4 2 5 5 5 5 1 1 2 2 1 2 4 3 1 4 4 1 1 2 5 1 1 4 5 5 1 5 5 1 2
## [38] 2 1 5 1 5 2 2 4 2 4 1 1 2 2 2 2 4 4 2 4 2 1 2 1 1 5 5 5 2 2 1 5 4 5 5 2 3
## [75] 2 2 1 5 4 1 2 1 1 1 5 4 1 4 1 2 3 1 4 2 1 3 1 2 3 1 2 1 1 5 4 2 3 2 1 1 1
## [112] 2 2 1 1 1 2 1 4 1 2 1 2 5 1 1 5 1 1 4 2 4 4 1 2 2 4 4 1 2 1 2 3 5 2 3 1 5
## [149] 1 1 4 5 4 3 1 1 5 1 1 2 5 2 1 1 1 2 2 4 2 5 2 4 2 4 5 4 1 4 1 1 4 3 2 2 5
## [186] 1 1 4 2 4 1 5 2 1 1 1 2 1 5 4 4 1 4 3 5 3 2 1 5 2 1 4 1 5

table(study1$EITB_pattern, M5$predclass)

##
##      1 2 3 4 5
## 0000000 0 0 0 31 0
## 0110000 0 0 12 0 0
## 1000000 0 0 0 9 0
## 1010000 0 1 0 0 0
## 1100000 0 3 0 0 0
## 1110000 0 46 0 0 0
## 1110001 0 0 0 0 16
## 1110010 0 4 0 0 0
## 1110011 0 0 0 0 8
## 1110101 0 0 0 0 3
## 1110111 0 0 0 0 2
## 1111001 0 0 0 0 3
## 1111011 0 0 0 0 3
## 1111100 1 0 0 0 0

```

```

## 1111101 3 0 0 0 0
## 1111110 3 0 0 0 0
## 1111111 66 0 0 0 0

###Crear modelo de 6 clases
M6<-poLCA(cbind(b1, b2, b3, b4, b5, b6, b7)~1, maxiter=50000, nclass=6, nrep=10,
data=study1)

## Model 1: llik = -452.8262 ... best llik = -452.8262
## Model 2: llik = -452.8262 ... best llik = -452.8262
## Model 3: llik = -452.8262 ... best llik = -452.8262
## Model 4: llik = -453.972 ... best llik = -452.8262
## Model 5: llik = -452.8317 ... best llik = -452.8262
## Model 6: llik = -452.8317 ... best llik = -452.8262
## Model 7: llik = -452.8317 ... best llik = -452.8262
## Model 8: llik = -454.1758 ... best llik = -452.8262
## Model 9: llik = -453.1491 ... best llik = -452.8262
## Model 10: llik = -452.8262 ... best llik = -452.8262
## Conditional item response (column) probabilities,
## by outcome variable, for each class (row)
##
## $b1
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.0000 1.0000
## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 0.0000 1.0000
## class 4: 0.1935 0.8065
## class 5: 0.0000 1.0000
## class 6: 0.7758 0.2242
##
## $b2
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.0000 1.0000
## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 0.0000 1.0000
## class 4: 0.0169 0.9831
## class 5: 0.0000 1.0000
## class 6: 1.0000 0.0000
##
## $b3
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.0000 1.0000
## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 0.0000 1.0000
## class 4: 0.0492 0.9508
## class 5: 0.0000 1.0000
## class 6: 1.0000 0.0000
##
## $b4
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.0000 1.0000
## class 2: 1.0000 0.0000
## class 3: 0.8421 0.1579

```

```

## class 4: 1.0000 0.0000
## class 5: 0.0146 0.9854
## class 6: 1.0000 0.0000
##
## $b5
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.0000 1.0000
## class 2: 1.0000 0.0000
## class 3: 0.8421 0.1579
## class 4: 1.0000 0.0000
## class 5: 0.0310 0.9690
## class 6: 1.0000 0.0000
##
## $b6
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.2500 0.7500
## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 0.7262 0.2738
## class 4: 1.0000 0.0000
## class 5: 0.0000 1.0000
## class 6: 1.0000 0.0000
##
## $b7
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.2909 0.7091
## class 2: 0.6734 0.3266
## class 3: 0.0000 1.0000
## class 4: 1.0000 0.0000
## class 5: 0.0000 1.0000
## class 6: 1.0000 0.0000
##
## Estimated class population shares
## 0.0643 0.0278 0.1452 0.29 0.2862 0.1867
##
## Predicted class memberships (by modal posterior prob.)
## 0.0327 0.0187 0.1495 0.2897 0.3224 0.1869
##
## =====
## Fit for 6 latent classes:
## =====
## number of observations: 214
## number of estimated parameters: 47
## residual degrees of freedom: 80
## maximum log-likelihood: -452.8262
##
## AIC(6): 999.6524
## BIC(6): 1157.853
## G^2(6): 1.785982 (Likelihood ratio/deviance statistic)
## X^2(6): 1.026207 (Chi-square goodness of fit)
##
###Distribución de patrones de bandas de EITB según clases
M6$predclass

```

```
## [1] 5 6 6 6 1 6 6 4 3 3 3 3 5 5 4 4 5 4 6 4 5 6 6 5 5 4 3 5 5 6 3 3 5 3 5 5 4
## [38] 2 5 3 5 3 4 4 6 4 6 5 5 4 4 4 4 6 6 4 6 4 5 4 5 5 3 3 3 4 4 5 3 6 3 3 4 4
## [75] 4 4 5 3 6 5 4 1 5 5 3 6 1 6 5 4 4 1 6 4 5 4 5 2 4 5 4 5 5 3 6 4 4 4 5 5 5
## [112] 4 4 5 5 5 4 5 6 5 4 1 4 3 5 5 3 5 5 6 4 6 6 1 4 4 6 6 5 4 5 4 4 3 4 4 5 5
## [149] 5 5 6 3 6 4 5 5 3 5 5 4 3 4 5 5 5 4 4 6 2 3 2 6 4 6 3 6 5 6 5 1 6 4 4 4 3
## [186] 5 5 6 4 6 5 3 4 5 5 5 4 5 3 6 6 5 6 4 5 4 4 5 3 4 5 6 5 3
```

```
table(study1$EITB_pattern, M6$predclass)
```

```
##
##      1 2 3 4 5 6
## 000000 0 0 0 0 0 31
## 0110000 0 0 0 12 0 0
## 1000000 0 0 0 0 0 9
## 1010000 0 0 0 1 0 0
## 1100000 0 0 0 3 0 0
## 1110000 0 0 0 46 0 0
## 1110001 0 0 16 0 0 0
## 1110010 0 4 0 0 0 0
## 1110011 0 0 8 0 0 0
## 1110101 0 0 3 0 0 0
## 1110111 0 0 2 0 0 0
## 1111001 0 0 3 0 0 0
## 1111011 0 0 0 0 3 0
## 1111100 1 0 0 0 0 0
## 1111101 3 0 0 0 0 0
## 1111110 3 0 0 0 0 0
## 1111111 0 0 0 0 66 0
```

ANEXO 2: Análisis de clases latentes – Estudio 2

```
###Ubicar el directorio de trabajo
setwd("/Volumes/GF_USB2/Analisis_tesis")

###Importar la base6
study2<-read.csv("data_LCA_study2.csv")

###Recodificar la variable "Patrones de bandas"
study2$EITB_patttern<-factor(study2$EITB_patttern, levels=c(1,2,3,5,7,8,9,10,12),
labels=c("0000000","0110000","1000000","1100000","1110000","1110001","1110010","
1110011","1111111"))

###Descargar el comando para hacer análisis de clases latentes
library(poLCA)

## Loading required package: scatterplot3d

## Loading required package: MASS

###Crear modelo de 2 clases
M2<-poLCA(cbind(b1, b2, b3, b4, b5, b6, b7)~1, maxiter=50000, nclass=2, nrep=10,
data=study2)

## Model 1: llik = -890.4076 ... best llik = -890.4076
## Model 2: llik = -890.4076 ... best llik = -890.4076
## Model 3: llik = -890.4076 ... best llik = -890.4076
## Model 4: llik = -890.4076 ... best llik = -890.4076
## Model 5: llik = -890.4076 ... best llik = -890.4076
## Model 6: llik = -890.4076 ... best llik = -890.4076
## Model 7: llik = -1008.79 ... best llik = -890.4076
## Model 8: llik = -890.4076 ... best llik = -890.4076
## Model 9: llik = -890.4076 ... best llik = -890.4076
## Model 10: llik = -890.4076 ... best llik = -890.4076
## Conditional item response (column) probabilities,
## by outcome variable, for each class (row)
##
## $b1
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.0874 0.9126
## class 2: 0.5285 0.4715
##
## $b2
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1:   0   1
## class 2:   1   0
##
## $b3
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.1359 0.8641
## class 2: 1.0000 0.0000
```

[illegible]

```
## [334] 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 1 1 1 1 2 1 2 1 1 2 2 2 2 2 1 2 2 1 2 1 1 2 1
## [371] 1 1 1 2 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1 2 1 1 1 1
## [408] 1 1 1 1 1 1 2 2 1 1 2 1 2 2 2 2 2 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1 1 2 1 1 1 2 1
## [445] 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 1 1 2 1 1 2 1 1 2 1
```

```
table(study2$EITB_patttern, M2$predclass)
```

```
##
##      1  2
## 0000000 0 139
## 0110000 18  0
## 1000000 0 124
## 1100000 28  0
## 1110000 120 0
## 1110001  5  0
## 1110010 15  0
## 1110011 11  0
## 1111111  9  0
```

Crear modelo de 3 clases

```
M3<-poLCA(cbind(b1, b2, b3, b4, b5, b6, b7)~1, maxiter=50000, nclass=3, nrep=10,
data=study2)
```

```
## Model 1: llik = -809.1193 ... best llik = -809.1193
## Model 2: llik = -809.1193 ... best llik = -809.1193
## Model 3: llik = -875.3909 ... best llik = -809.1193
## Model 4: llik = -809.1193 ... best llik = -809.1193
## Model 5: llik = -809.1193 ... best llik = -809.1193
## Model 6: llik = -809.1193 ... best llik = -809.1193
## Model 7: llik = -809.1193 ... best llik = -809.1193
## Model 8: llik = -809.1193 ... best llik = -809.1193
## Model 9: llik = -809.1193 ... best llik = -809.1193
## Model 10: llik = -809.1193 ... best llik = -809.1193
## Conditional item response (column) probabilities,
## by outcome variable, for each class (row)
##
## $b1
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.5285 0.4715
## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 0.0964 0.9036
##
## $b2
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1:   1   0
## class 2:   0   1
## class 3:   0   1
##
## $b3
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1:  1.00 0.00
## class 2:  0.00 1.00
## class 3:  0.15 0.85
```

```

##
## $b4
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 1.000 0.000
## class 2: 0.534 0.466
## class 3: 1.000 0.000
##
## $b5
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 1.000 0.000
## class 2: 0.534 0.466
## class 3: 1.000 0.000
##
## $b6
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 1.000 0.000
## class 2: 0.000 1.000
## class 3: 0.916 0.084
##
## $b7
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 1.0000 0.0000
## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 0.9695 0.0305
##
## Estimated class population shares
## 0.5608 0.0412 0.3981
##
## Predicted class memberships (by modal posterior prob.)
## 0.5608 0.0426 0.3966
##
## =====
## Fit for 3 latent classes:
## =====
## number of observations: 469
## number of estimated parameters: 23
## residual degrees of freedom: 104
## maximum log-likelihood: -809.1193
##
## AIC(3): 1664.239
## BIC(3): 1759.703
## G^2(3): 45.4813 (Likelihood ratio/deviance statistic)
## X^2(3): 31.24583 (Chi-square goodness of fit)
##
###Distribución de patrones de bandas de EITB según clases
M3$predclass

## [1] 3 3 2 3 3 2 3 3 3 3 3 2 3 2 3 3 3 3 3 3 2 3 3 3 3 3 3 2 3 3 3 3 3 3 3
## [38] 3 3 3 3 1 3 3 1 1 3 1 1 1 1 1 1 1 3 1 1 3 1 1 1 1 3 1 1 1 1 3 1 1 1 1
## [75] 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 3 1 3 3 3 3 3 1 1 3 1 1 1 1 3 3 3 1 1 1
## [112] 1 1 1 1 3 1 3 1 1 3 3 2 1 1 1 1 1 1 1 3 3 3 3 1 1 1 1 3 1 1 1 1 3 1 1 1
## [149] 1 1 1 3 1 1 1 1 1 1 3 3 1 1 3 3 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 3 3 3 3 3 3 1 1 1

```

```
## [186] 1 3 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 3 3 3 3 1 3 3 3 1 1 1 3 1 1 1 1 3 3
## [223] 3 3 3 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 3 1 1 1 3 1 1 3 1 3 1 1 3 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
## [260] 1 1 1 1 3 3 3 3 3 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 3 3 1 1 3 1 3 1 3 3 1
## [297] 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 3 3 1 1 3 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 3 1 1 1 1 1
## [334] 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 3 3 3 3 1 3 1 3 1 3 3 1 1 1 1 1 3 1 1 3 1 2 3 1 3
## [371] 3 3 3 1 3 2 3 3 3 3 3 1 3 3 3 3 2 1 3 3 3 3 2 3 3 2 1 3 3 3 2 2 1 3 3 3 3
## [408] 3 3 3 2 3 3 1 1 3 3 1 3 1 1 1 1 1 3 3 2 2 3 3 3 2 1 3 3 3 3 3 1 3 3 3 1 3
## [445] 3 2 2 3 3 3 3 1 3 3 3 3 3 3 3 3 1 1 3 3 1 3 3 1 3
```

```
table(study2$EITB_patttern, M3$predclass)
```

```
##
##      1  2  3
## 0000000 139  0  0
## 0110000  0  0 18
## 1000000 124  0  0
## 1100000  0  0 28
## 1110000  0  0 120
## 1110001  0  0  5
## 1110010  0  0 15
## 1110011  0 11  0
## 1111111  0  9  0
```

###Crear modelo de 4 clases

```
M4<-poLCA(cbind(b1, b2, b3, b4, b5, b6, b7)~1, maxiter=50000, nclass=4, nrep=10,
data=study2)
```

```
##Model 1: llik = -802.3695 ... best llik = -802.3695
##Model 2: llik = -809.1193 ... best llik = -802.3695
##Model 3: llik = -802.3695 ... best llik = -802.3695
##Model 4: llik = -802.3695 ... best llik = -802.3695
##Model 5: llik = -809.1193 ... best llik = -802.3695
##Model 6: llik = -790.0899 ... best llik = -790.0899
##Model 7: llik = -802.3695 ... best llik = -790.0899
##Model 8: llik = -803.8033 ... best llik = -790.0899
##Model 9: llik = -802.3695 ... best llik = -790.0899
##Model 10: llik = -802.3695 ... best llik = -790.0899
##Conditional item response (column) probabilities,
## by outcome variable, for each class (row)
```

```
##
## $b1
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.1127 0.8873
## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 0.0000 1.0000
## class 4: 0.5285 0.4715
```

```
##
## $b2
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1:  0   1
## class 2:  0   1
## class 3:  0   1
## class 4:  1   0
```

```

##
## $b3
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.1753 0.8247
## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 0.0000 1.0000
## class 4: 1.0000 0.0000
##
## $b4
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1:   1   0
## class 2:   0   1
## class 3:   1   0
## class 4:   1   0
##
## $b5
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1:   1   0
## class 2:   0   1
## class 3:   1   0
## class 4:   1   0

## $b6
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 1.0000 0.0000
## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 0.3017 0.6983
## class 4: 1.0000 0.0000
##
## $b7
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 1.0000 0.0000
## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 0.5703 0.4297
## class 4: 1.0000 0.0000
##
## Estimated class population shares
## 0.3407 0.0192 0.0794 0.5608
##
## Predicted class memberships (by modal posterior prob.)
## 0.3539 0.0192 0.0661 0.5608
##
## =====
## Fit for 4 latent classes:
## =====
## number of observations: 469
## number of estimated parameters: 31
## residual degrees of freedom: 96
## maximum log-likelihood: -790.0899
##
## AIC(4): 1642.18
## BIC(4): 1770.85
## G^2(4): 7.422524 (Likelihood ratio/deviance statistic)

```

```

## X^2(4): 4.326126 (Chi-square goodness of fit)
##
###Distribución de patrones de bandas de EITB según clases
M4$predclass

## [1] 3 1 4 1 3 4 3 3 3 3 1 4 1 4 3 3 3 3 3 4 3 1 3 3 3 1 1 4 3 3 1 1 3 3 3 1
## [38] 3 3 3 3 2 3 3 2 2 3 2 2 2 2 2 2 2 2 3 2 2 3 2 2 2 2 3 2 2 2 2 3 2 2 2 2
## [75] 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3 2 3 3 3 3 3 2 2 3 2 2 2 2 3 3 3 2 2 2
## [112] 2 2 2 2 3 2 3 2 2 3 3 4 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 2 2 2 2 3 2 2 2 2 3 2 2 2
## [149] 2 2 2 3 2 2 2 2 2 2 3 3 2 2 1 3 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 2 2 2
## [186] 2 3 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3 1 1 3 2 3 3 3 2 2 2 3 2 2 2 2 3 3
## [223] 3 3 3 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3 2 2 2 3 2 2 3 2 3 2 2 3 2 2 2 2 2 2 2 2 2
## [260] 2 2 2 2 3 3 3 3 3 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 2 2 3 2 3 2 3 3 2
## [297] 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 2 2 3 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3 2 2 2 2
## [334] 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 2 3 2 3 2 3 1 2 2 2 2 2 3 2 2 1 2 4 3 2 1
## [371] 3 3 1 2 1 4 3 3 3 3 1 2 3 3 3 3 4 2 3 3 1 3 4 3 3 4 2 3 3 3 4 4 2 3 3 1 3
## [408] 3 3 1 4 3 3 2 2 3 3 2 3 2 2 2 2 2 3 3 4 4 3 3 3 4 2 3 3 3 3 3 2 3 3 1 2 3
## [445] 1 4 4 1 3 3 3 2 3 3 3 3 3 1 1 3 2 2 3 3 2 3 1 2 3

table(study2$EITB_pattern, M4$predclass)

##
##      1  2  3  4
## 0000000  0  0  0 139
## 0110000 18  0  0  0
## 1000000  0  0  0 124
## 1100000 28  0  0  0
## 1110000 120 0  0  0
## 1110001  0  0  5  0
## 1110010  0  0 15  0
## 1110011  0  0 11  0
## 1111111  0  9  0  0
##
###Crear modelo de 5 clases
M5<-poLCA(cbind(b1, b2, b3, b4, b5, b6, b7)~1, maxiter=50000, nclass=5, nrep=10,
data=study2)

## Model 1: llik = -802.3695 ... best llik = -802.3695
## Model 2: llik = -803.7624 ... best llik = -802.3695
## Model 3: llik = -790.0899 ... best llik = -790.0899
## Model 4: llik = -802.3695 ... best llik = -790.0899
## Model 5: llik = -789.9192 ... best llik = -789.9192
## Model 6: llik = -802.3695 ... best llik = -789.9192
## Model 7: llik = -786.3787 ... best llik = -786.3787
## Model 8: llik = -786.3787 ... best llik = -786.3787
## Model 9: llik = -802.3695 ... best llik = -786.3787
## Model 10: llik = -802.3695 ... best llik = -786.3787
## Conditional item response (column) probabilities,
## by outcome variable, for each class (row)
##
## $b1
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.6087 0.3913

```

```

## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 0.5285 0.4715
## class 4: 0.0000 1.0000
## class 5: 0.0000 1.0000
##
## $b2
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1:   0   1
## class 2:   0   1
## class 3:   1   0
## class 4:   0   1
## class 5:   0   1
##
## $b3
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.000 1.000
## class 2: 0.000 1.000
## class 3: 1.000 0.000
## class 4: 0.216 0.784
## class 5: 0.000 1.000
##
## $b4
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1:   1   0
## class 2:   0   1
## class 3:   1   0
## class 4:   1   0
## class 5:   1   0
##
## $b5
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1:   1   0
## class 2:   0   1
## class 3:   1   0
## class 4:   1   0
## class 5:   1   0
##
## $b6
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 1.0000 0.0000
## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 1.0000 0.0000
## class 4: 1.0000 0.0000
## class 5: 0.3125 0.6875
##
## $b7
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 1.0000 0.0000
## class 2: 0.0000 1.0000
## class 3: 1.0000 0.0000
## class 4: 1.0000 0.0000
## class 5: 0.5769 0.4231
##

```

```

## Estimated class population shares
## 0.063 0.0192 0.5608 0.2764 0.0806
##
## Predicted class memberships (by modal posterior prob.)
## 0.0384 0.0192 0.5608 0.3156 0.0661
##
## =====
## Fit for 5 latent classes:
## =====
## number of observations: 469
## number of estimated parameters: 39
## residual degrees of freedom: 88
## maximum log-likelihood: -786.3787
##
## AIC(5): 1650.757
## BIC(5): 1812.631
## G^2(5): 6.600167e-10 (Likelihood ratio/deviance statistic)
## X^2(5): 3.300329e-10 (Chi-square goodness of fit)
##

###Distribución de patrones de bandas de EITB según clases
M5$predclass

## [1] 1 4 5 4 5 2 1 1 1 1 4 2 4 2 5 4 4 4 4 1 5 4 4 4 4 4 4 5 4 4 4 4 4 4 4
## [38] 5 4 4 4 3 4 4 3 3 4 3 3 3 3 3 3 3 4 3 3 1 3 3 3 3 4 3 3 3 3 4 3 3 3 3
## [75] 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 4 3 4 4 4 4 4 3 3 4 3 3 3 3 4 4 3 3 3
## [112] 3 3 3 3 4 3 4 3 3 4 4 5 3 3 3 3 3 3 3 4 4 4 4 3 3 3 3 4 3 3 3 3 5 3 3 3
## [149] 3 3 3 4 3 3 3 3 3 3 4 4 3 3 4 4 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 4 4 4 4 4 4 3 3 3
## [186] 3 4 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 4 4 4 4 3 4 4 4 3 3 3 4 3 3 3 3 4 4
## [223] 4 1 4 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 4 3 3 3 4 3 3 4 3 3 4 3 3 5 3 3 3 3 3 3 3 3
## [260] 3 3 3 3 4 4 4 5 4 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 4 4 3 3 4 3 4 3 4 3
## [297] 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 5 4 3 3 4 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 4 3 3 3 3
## [334] 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 1 5 4 4 3 4 3 4 3 4 4 3 3 3 3 3 4 3 3 4 3 2 5 3 4
## [371] 4 4 4 3 4 2 4 5 5 4 4 3 4 4 5 4 5 3 5 4 4 1 5 5 1 5 3 1 4 4 5 5 3 4 4 4 1
## [408] 4 4 4 5 4 4 3 3 4 1 3 1 3 3 3 3 5 4 2 2 5 5 4 2 3 4 4 5 4 4 3 4 4 4 3 1
## [445] 4 2 5 4 4 1 4 3 5 4 4 4 1 4 4 4 3 3 4 4 3 4 4 3 5

table(study2$EITB_patttern, M5$predclass)

##
##      1  2  3  4  5
## 0000000  0  0 139  0  0
## 0110000 18  0  0  0  0
## 1000000  0  0 124  0  0
## 1100000  0  0  0 28  0
## 1110000  0  0  0 120  0
## 1110001  0  0  0  0  5
## 1110010  0  0  0  0 15
## 1110011  0  0  0  0 11
## 1111111  0  9  0  0  0

###Crear modelo de 6 clases
M6<-poLCA(cbind(b1, b2, b3, b4, b5, b6, b7)~1, maxiter=50000, nclass=6, nrep=10,
data=study2)

```

```

## Model 1: llik = -786.3787 ... best llik = -786.3787
## Model 2: llik = -786.3787 ... best llik = -786.3787
## Model 3: llik = -786.3787 ... best llik = -786.3787
## Model 4: llik = -786.3787 ... best llik = -786.3787
## Model 5: llik = -802.3695 ... best llik = -786.3787
## Model 6: llik = -802.3695 ... best llik = -786.3787
## Model 7: llik = -786.3787 ... best llik = -786.3787
## Model 8: llik = -786.3787 ... best llik = -786.3787
## Model 9: llik = -790.0899 ... best llik = -786.3787
## Model 10: llik = -802.3695 ... best llik = -786.3787
## Conditional item response (column) probabilities,
## by outcome variable, for each class (row)
##
## $b1
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.0000 1.0000
## class 2: 0.1959 0.8041
## class 3: 0.3608 0.6392
## class 4: 0.0000 1.0000
## class 5: 0.0000 1.0000
## class 6: 0.7990 0.2010
##
## $b2
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1:    0    1
## class 2:    0    1
## class 3:    1    0
## class 4:    0    1
## class 5:    0    1
## class 6:    1    0
##
## $b3
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.000 1.000
## class 2: 0.000 1.000
## class 3: 1.000 0.000
## class 4: 0.416 0.584
## class 5: 0.000 1.000
## class 6: 1.000 0.000
##
## $b4
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1:    0    1
## class 2:    1    0
## class 3:    1    0
## class 4:    1    0
## class 5:    1    0
## class 6:    1    0
##
## $b5
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1:    0    1
## class 2:    1    0

```

```

## class 3: 1 0
## class 4: 1 0
## class 5: 1 0
## class 6: 1 0
##
## $b6
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.0000 1.0000
## class 2: 1.0000 0.0000
## class 3: 1.0000 0.0000
## class 4: 1.0000 0.0000
## class 5: 0.3125 0.6875
## class 6: 1.0000 0.0000
##
## $b7
##      Pr(1) Pr(2)
## class 1: 0.0000 1.0000
## class 2: 1.0000 0.0000
## class 3: 1.0000 0.0000
## class 4: 1.0000 0.0000
## class 5: 0.5769 0.4231
## class 6: 1.0000 0.0000
##
## Estimated class population shares
## 0.0192 0.1959 0.3461 0.1435 0.0806 0.2147
##
## Predicted class memberships (by modal posterior prob.)
## 0.0192 0.2942 0.2644 0.0597 0.0661 0.2964
##
## =====
## Fit for 6 latent classes:
## =====
## number of observations: 469
## number of estimated parameters: 47
## residual degrees of freedom: 80
## maximum log-likelihood: -786.3787
##
## AIC(6): 1666.757
## BIC(6): 1861.836
## G^2(6): 1.876365e-10 (Likelihood ratio/deviance statistic)
## X^2(6): 1.878233e-10 (Chi-square goodness of fit)
##

###Distribución de patrones de bandas de EITB según clases
M6$predclass

## [1] 2 4 5 4 5 1 2 2 2 2 4 1 4 1 5 2 2 2 2 2 5 2 4 2 2 2 4 4 5 2 2 4 4 2 2 2 4
## [38] 5 2 2 2 6 2 2 6 3 2 6 6 6 6 6 6 6 2 3 6 2 6 3 6 3 2 6 6 6 6 2 6 6 6 6 6
## [75] 3 3 3 6 6 3 6 6 6 6 6 3 6 6 6 6 6 2 6 2 2 2 2 6 6 2 6 3 3 6 2 2 2 6 6 6
## [112] 6 6 6 6 2 6 2 3 6 2 2 5 6 3 3 6 6 6 3 3 2 2 2 2 3 3 6 3 2 6 3 3 3 5 3 3 6
## [149] 3 3 3 2 3 3 3 3 3 2 2 6 6 4 2 3 3 3 3 3 3 6 6 6 6 2 2 2 2 2 2 2 6 6 6
## [186] 6 2 3 3 3 3 3 6 3 3 3 3 3 6 3 3 3 3 6 2 4 4 2 6 2 2 2 6 6 6 2 6 6 3 3 2 2
## [223] 2 2 2 6 6 3 3 3 3 3 6 6 3 6 2 3 6 3 2 3 6 2 6 2 3 6 5 3 6 6 6 6 6 3 3 6 3

```

```
## [260] 6 6 3 3 2 2 2 5 2 6 6 6 6 6 6 6 6 3 6 6 6 3 3 3 2 2 6 3 2 3 2 3 2 2 3
## [297] 3 3 3 6 3 3 3 3 3 3 6 6 3 6 5 2 6 6 2 6 6 6 3 6 3 6 6 6 3 3 6 2 6 6 6 6 6
## [334] 6 6 6 6 6 3 3 3 6 3 6 6 2 5 2 2 6 2 6 2 3 2 4 6 6 6 6 6 2 6 3 4 3 1 5 3 4
## [371] 2 2 4 3 4 1 2 5 5 2 4 3 2 2 5 2 5 3 5 2 4 2 5 5 2 5 3 2 2 2 5 5 3 2 2 4 2
## [408] 2 2 4 5 2 2 3 3 2 2 3 2 3 3 3 3 5 2 1 1 5 5 2 1 3 2 2 5 2 2 3 2 2 4 3 2
## [445] 4 1 5 4 2 2 2 3 5 2 2 2 2 4 4 2 3 3 2 2 3 2 4 3 5
```

```
table(study2$EITB_patttern, M6$predclass)
```

```
##
##      1  2  3  4  5  6
## 0000000 0  0  0  0  0 139
## 0110000 0 18  0  0  0  0
## 1000000 0  0 124  0  0  0
## 1100000 0  0  0 28  0  0
## 1110000 0 120  0  0  0  0
## 1110001 0  0  0  0  5  0
## 1110010 0  0  0  0 15  0
## 1110011 0  0  0  0 11  0
## 1111111 9  0  0  0  0  0
```