



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



TOGETHER
for a sustainable future

DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

CONTACT

Please contact publications@unido.org for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org

19124

224
técnicos

**PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA PARA
AMERICA LATINA Y EL CARIBE
PNUD/UNESCO/ONUDI
RLA/83/003**

Contrato No. 89/68

**Proyecto: Producción masiva de anticuerpos
monoclonales: un esfuerzo compartido en
América Latina**

Primer Año de Actividades

País: Ecuador

Segundo Informe Técnico (Final)

**"PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES
UN ESFUERZO COMPARTIDO EN AMERICA LATINA"**

Segundo Informe

Agosto 29/90

De: Dr. Luis Enrique Plaza Vélez

Para: Rodolfo Quintero, coordinador general ONUDI

Antecedentes.

Fundamentalmente, este informe abarca dos aspectos como es la de que el equipo de trabajo nuestro desarrolló con ayuda, hibridomas para producir anticuerpos monoclonales y también dar a conocer los aspectos administrativos desarrollados.

En concordancia con los términos de referencia de nuestro contrato el literal D hace referencia a: Estado de la cisticercosis en Ecuador y que forma parte del primer informe, mientras que ahora se reporta lo efectuado hasta el ensayo de los híbridos obtenidos.

Con estos antecedentes el informe prevee los siguientes aspectos:

A) Cultivo celular - pruebas en cisticercosis.

- 1.- Recolección de muestras de cisticercosis en estados os:
- 2.- Recolección y conservación de sueros - líquido cefaloraquídeo;
- 3.- Desarrollo de pruebas;
- 4.- Fusión celular y mantenimiento de híbridos. v;
- 5.- Pruebas de los hibridomas.

B) Compra de equipos e insumos.

C) Selección de candidato para entrenamiento en Cuba.

D) Conclusiones.

A.- Cultivo celular de pruebas en cisticercosis.

Este trabajo ha sido elaborado por el grupo de profesionales y técnicos que trabajan bajo mi jefatura en el laboratorio de inmunopatología del Hospital Regional del IESE en Guayaquil y son: Dra. Rosa Barba, Dr. Francisco Altamirano, Dr. Carlos Hidalgo, Quím. Carlos García, Lic. Biol. Monika Merino, Tec. Med. Adalina Plaza y Aux. Tec. Cesar Villazo. El trabajo se ha desarrollado entre 1989-1990 con el apoyo del centro de Inmunología y Hospital de Cancerología de Bogotá y con la asesoría del Dr. Oscar Orozco. El material biológico fue recolectado en nuestro país y transportado adecuadamente. El trabajo de búsqueda de antígenos, cultivo y purificación lo efectuó nuestro personal en Bogotá dado que no contábamos con medios propios instalados y la OAF recién aprueba la ayuda no reembolsable para el proyecto, las pruebas finales se han efectuado en nuestro laboratorio en Guayaquil con sueros de pacientes ecuatorianos.

La experiencia técnica se encuentra en el anexo señalado como número 2 toda vez que el primero es la situación de la cisticercosis en el país del primer informe.

B.- Compra de equipos e insumos.

Se ha receiptado 9.000 dólares por parte de Onudi que ha servido para completar los equipos que requerimos.

El sistema de selección así como las facturas mismas de lo adquirido se adjunta a este informe como anexo 3.

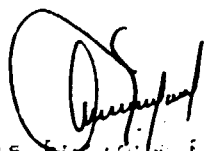
En todo caso, el buen apoyo para tener un sistema de congelación de líquidos, completar un sistema de purificación y reactivos químicos es ideal e ideal. En último se ha podido comprar las unidades de agua el cual incluye a Fipet-All.

C.- Selección de candidato para entrenamiento en Cuba.

Se ha seleccionado a María Heredia para que se entrene en Cuba de acuerdo con lo acordado en la reunión de la Habana del 4 al 7 de agosto y cuyo currículum fue aceptado por el coordinador Jorge Gavilondo. Se espera que ella pueda continuar en la segunda fase en el mismo centro.

D.- Conclusiones

- D.1.- El equipo de trabajo en Guayaquil está en capacidad de producir hibridomas así como purificar y probar la sensibilidad y especificidad de anticuerpos monoclonales.
- D.2.- Se ha producido AcM contra cisticercos de baja reactividad y los hibridomas producidos luego de haberse probado no son aptos para presentar como candidato a un escalamiento.
- D.3.- El efecto de cooperación paralela ha resultado beneficioso y se espera adquirir la experiencia suficiente en las fases nuevas de entrenamiento a la que iniciaremos de acuerdo al programa a desarrollar en Cuba.
- D.4.- Se aspira repetir la experiencia de obtención de AcM con alguna variante estratégica para el caso de los cisticercos.



Dr. Luis Enrique Plaza Salas
JEFE INMUNOPATOLOGIA I.E.S.S.
COORDINADOR PROYECTO AcM
Guayaquil.

ANEXO 2.

REPORTE TECNICO

A. CULTIVO CELULAR-PRUEBAS EN CISTICERCOSIS

Por ser la provincia del Chimborazo una de las de mayor incidencia de Cisticercosis humana y porcina, se escogió como area base para la recolección de muestras.

La recolección de Quistes se efectuó principalmente en el Camal Frigorífico de la ciudad de Riobamba, a partir de los músculos de cerdos infectados.

Durante seis meses de trabajo se procedió a realizar lo que a continuación se señala:

1- RECOLECCION DE MUESTRAS DE QUISTES DE CISTICERCOS EN MATADEROS

Se llenó una ficha de identificación para cada cerdo (Ficha 1) y:

- A- Se liberó los cisticercos de toda carne pericapsular, tratando que no se rompan los quistes.
- B- Lavado en PBS frío por tres cambios.
- C- Congelación sin PBS (sólo quistes).

2- RECOLECCION Y CONSERVACION DE SUEROS/LIQUIDO CEFALORAQUIDEO

Se seleccionaron muestras de pacientes que presentaron síntomas, signos, neurocisticercosis, epilepsias parciales y Cisticercosis confirmada por serología, radiografía y tomografía axial computarizada.

Para este propósito se elaboró un ficha de recolección para cada paciente. (Ficha 2).

3- DESARROLLO DE PRUEBAS

Con los quistes de Cisticercosis se obtuvo:

- a- Cortes por Congelación, los mismos que incluyen tanto material como espoler; y
- b- Antígeno crudo (total).

Se revisaron los expedientes clínicos de pacientes atendidos en el servicio de Neurología del Hospital del Seguro Social de Riobamba y se tomó como grupo de estudio a aquellos pacientes que registraron el diagnóstico presuntivo de Cisticercosis cerebral además de aquellos pacientes que mostraron cuadro clínico con síntomas y signos sugestivos pero que no se había llegado a diagnóstico. Luego de la elaboración de la ficha de datos, se visitó a los pacientes en sus domicilios para lograr la recolección de una muestra de sangre. Paralelamente se tomaron muestras y revisaron casos del Hospital del IESS de Guayaquil.

De acuerdo con lo establecido en el protocolo, desarrollado conjuntamente en Bogotá, se apreció que la estructura proteica de los quistes de cisticercos es muy compleja, por lo que las fracciones antigénicas responsables de la respuesta inmune son numerosas.

Un extracto crudo del quiste se obtuvo luego de la disección del material infectado que se homogenizó, sonicó y centrifugó.

En la separación de las proteínas de esta mezcla, se utilizó electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE) con patrones de peso molecular y se obtuvo bandas proteicas que fluctúan entre 149 a 43 mil Daltons de peso molecular, en número de 14 a 30 en las distintas preparaciones, siendo 14 las bandas constantes en todas.

Simultáneamente, con esta mezcla antigénica se inmunizaron ratones de la cepa Balb/c. A inmunizaciones de 50 microlitros de antígeno a cada uno en los días 1, 7, 14 y 21, empezando previamente a las inoculaciones para obtener cantidades de los títulos de anticuerpos.

En la identificación de las bandas con posible actividad antigénica se realizó un dot blotting, enfrentando suero de pacientes diagnosticados de cisticercosis por tomografía axial y suero de los ratones inmunizados. Se utilizó como control negativo el suero de personas normales y de ratón normal.

En esta primera fase se obtuvo identificación de 10 bandas con posible actividad antigénica cuyos pesos moleculares son: 120, 105, 101, 79, 74, 57, 50, 45, 38 y 24 mil Daltons.

Con los ratones inmunizados se identificaron 4 bandas cuyos pesos moleculares fueron de 101, 74, 57 y 52

4.- FUSION CELULAR Y MANTENIMIENTO DE HIBRIDOS

4.1.- Selección de la línea de Mieloma

"Los híbridos derivados de Linfocitos inmunes y células de Mieloma que producen cadenas livianas y pesadas o solo livianas producen las cadenas inmunoglobulinas de ambas parentales. Estas cadenas pueden ensamblarse en diferentes combinaciones y el anticuerpo híbrido resultante a menudo pierde uno o los dos sitios de unión al antígeno". Razón por la cual decidimos seleccionar una línea de Mieloma no productora de anticuerpos o cadenas livianas, para ello se realizaron las técnicas de Inmunodott e Inmunoelectroforesis con tres líneas de Mieloma: P3V, P3x63 Ag8 y NS0; los resultados nos revelaron que la línea de Mieloma P3V era la más óptima. (IX-09-89)

4.2.- Selección de la línea de Mieloma P3V con 8 Azaquanina y medio HAT

4.3.- Selección del ratón para la fusión.

Los ratones que se inmunizaron fueron de la cepa Balb/c

Primera inmunización: VI-21-89

Segunda inmunización: VII-08-89

Tercera inmunización: VII-15-89

El 1-1-89 se hicieron análisis a los linfocitos para lo cual para examinar el título de anticuerpo el cual debería ser mayor de 1:1000 para ello se utilizó la técnica de Inmunodott.

Resultados:

Ratón caja No. 5:

Pre-inoculación: Negativo hasta 1/2.000

Post-inoculación: 1/50 ++++
 1/200 +++
 1/500 ++
 1/1.000 +
 1/2.000 +

Ratones Caja No. 25 OD y OI, se obtuvieron los mismos títulos para ambos ratones:

1/50 - ++++
1/200 - +++
1/500 - ++
1/1.000 -
1/2.000 -

Basándonos en estos resultados decidimos escoger el ratón No. 5.

4.4.- Crecimiento en fase logarítmica de las células de Mieloma en el momento de la fusión. (IX-16-89) - (09-26-89)

Para ello fué necesario determinar el tiempo de multiplicación, el cual obtuvimos aplicando la fórmula:

$$T = \frac{0.693 \cdot T_0}{\log \frac{C}{N}}$$

Donde C = Número de células finales

C

N = Número de células iniciales.

T = Tiempo entre cada uno de estos conteos.

Obtuvimos que el tiempo de multiplicación era de 19.052 horas.

Para saber en que tiempo tendríamos la cantidad óptima de células para la fusión despejamos de la fórmula No sabiendo que N debería ser aproximadamente de 20 a 50.000.000 de células.

4.5.- Preparación de Medios

Se prepararon los medios HAT, H1 y medio de lavados siguiendo el procedimiento del manual; el medio HAT se puso a prueba con hibridomas ya estables y con las células de Mieloma F3U.

4.6.- "Dado que la fusión de blastos de células plasmáticas en división para las células de Mieloma es muy probable las que van a generar hibridomas productoras de anticuerpos, es necesario inmunizar el ratón vía intraperitoneal con el antígeno soluble, 3 y 4 días antes de la fusión."

El 1x-22-69 se inoculó el ratón de la caja No. 5 con 0.2 ml del antígeno en solución salina. Al día siguiente se hizo lo mismo (23-1x-69).

4.7.- Fusión

El protocolo de fusión utilizado es una adaptación del original descrito por Köpfer y Miller (1969) en Science, 61, Nueva E.C. Fuente: G. G. Gutterman, G.P. and Edward, G.D. Nature Dec:1971, 231, 1.

X-2-69 = Separación de clones, se decide utilizar número

X-5-69 = 10 clones seleccionados

X-10-69 = 10 clones seleccionados, se combinan con los clones de la línea de mieloma F3U, se combinan en 10.

X-11-69 = 10 clones seleccionados, se combinan con los clones de la línea

X-12-69 = 10 clones seleccionados, se combinan con los clones de la línea de mieloma F3U, se combinan en 10, se combinan con los clones de la línea de mieloma F3U, se combinan en 10, se combinan con los clones de la línea de mieloma F3U, se combinan en 10.

X-13-69 = 10 clones seleccionados, se combinan con los clones de la línea de mieloma F3U, se combinan en 10, se combinan con los clones de la línea de mieloma F3U, se combinan en 10.

X-14-69 = Separación de clones, incluidos los anteriores:

++ : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20

++ : 21, 22

++ : 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36

++ : 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50

++ : 51, 52

Nota: Cis 1 bajó la reactividad

Cis 17 es inespecifico, se observa positividad en todo el pozo por lo tanto se decide congelar una bala.

X-16-89 - Se hace clonate de Cis 6 y Cis 7

Se prueban clones (+++), algunos de (++) por ser clones provenientes de caja grande de 24 pozos y por calidad de células al microscopio:

Antígenos:

- 1 - VI-01-89
- 2 - Sonicado VII-89
- 3 - Sobrenadante VIII-89
- 4 - Cerebro.

Con el antígeno VI-89:

VI-89	+++:	Cis	6,7,41,43,99
	++:	"	8,35,37,61
	++:	"	14,17,30,50
	+-:	"	13,96,104,1
	-:	"	52,70,78

Con el sonicado VII-89:

VII-89	+++:	Cis	35,99
	++:	"	14,17
	++:	"	13,30,37,41
	+-:	"	8,104,70,37
	-:	"	7,13,52,61,70,96,43

Con el sobrenadante VIII-89:

VIII-89	+++:	Cis	1
	++:	"	7,30,35,37,61
	++:	"	13,17
	+-:	"	8,50
	-:	"	8,14,41,43,52,70,96,104,1

Cerebro: Negativos.

X-15-69 Las células que presentan la misma reactividad (+++) en dots se deciden congelar 2 bales una a 70 grados centígrados y otra en tanque de nitrógeno:

Cis. 1, 3, 7, 8, 13, 14, 30, 35, 37, 41, 50, 52, 61, 70, 78, 87, 98, 99, 104

Para ello se multiplican los 20 híbridos en caja de 24 (2 pozos para cada uno)

Nota: Cis 100 y 43 no se siguieron cultivando porque las células se encontraban en mal estado. además Cis 100 perdió reactividad.

X-18-69 En total se han obtenido 26 híbridos entonces los cuales seguiremos estudiando mediante las técnicas de inmunotransferencia e inmunoprecipitación.

Cis: 1, 3, 7, 8, 13, 14, 17, 30, 35, 37, 41, 50, 52, 61, 70, 78, 87, 98, 99, 104, 113, 122, 151, 152, 165, 168.

PRIMER INMUNODOTT

Tabla No. 1

I	Anticuerpos	I	Anticuerpos	I	Anticuerpos	I
I		I		I		I
I		I		I		I
I		I		I		I
I	Cis 1 = +++	I	Cis 26 = -	I	Cis 51 = ++	I
I	" 2 = ++	I	" 27 = -	I	" 52 = ++	I
I	" 3 = -	I	" 28 = ++	I	" 53 = +	I
I	" 4 = -	I	" 29 = -	I	" 54 = -	I
I	" 5 = -	I	" 30 = ++	I	" 55 = -	I
I	" 6 = +++	I	" 31 = +	I	" 56 = -	I
I	" 7 = +++	I	" 32 = +	I	" 57 = -	I
I	" 8 = +++	I	" 33 = +	I	" 58 = +	I
I	" 9 = -	I	" 34 = -	I	" 59 = +	I
I	" 10 = -	I	" 35 = +++	I	" 60 = -	I
I	" 11 = -	I	" 36 = +	I	" 61 = +++	I
I	" 12 = -	I	" 37 = ++	I	" 62 = -	I
I	" 13 = +++	I	" 38 = -	I	" 63 = -	I
I	" 14 = +++	I	" 39 = -	I	" 64 = -	I
I	" 15 = +-	I	" 40 = -	I	" 65 = -	I
I	" 16 = ++	I	" 41 = ++	I	" 66 = -	I
I	" 17 = +++	I	" 42 = -	I	" 67 = -	I
I	" 18 = -	I	" 43 = ++	I	" 68 = -	I
I	" 19 = -	I	" 44 = -	I	" 69 = -	I
I	" 20 = -	I	" 45 = -	I	" 70 = +++	I
I	" 21 = ++	I	" 46 = -	I	" 71 = -	I
I	" 22 = -	I	" 47 = -	I	" 72 = -	I
I	" 23 = -	I	" 48 = -	I	" 73 = -	I
I	" 24 = -	I	" 49 = -	I	" 74 = +	I
I	" 25 = -	I	" 50 = +++	I	" 75 = -	I
I		I		I		I
I		I		I		I
I		I		I		I

Continuación Tabla No. 1

Anticuerpos	Anticuerpos	Anticuerpos
Cis 76 = -	Cis 100 = +++	Cis 124 = +
" 77 = -	" 101 = +	" 125 = ++
" 78 = +++	" 102 = -	" 126 = -
" 79 = -	" 103 = +	" 127 = -
" 80 = -	" 104 = +++	" 128 = -
" 81 = ++	" 105 = -	" 129 = -
" 82 = -	" 106 = -	" 130 = -
" 83 = -	" 107 = -	" 131 = -
" 84 = -	" 108 = -	" 132 = -
" 85 = ++	" 109 = -	" 133 = -
" 86 = -	" 110 = -	" 134 = -
" 87 = +	" 111 = -	" 135 = -
" 88 = -	" 112 = +	" 136 = -
" 89 = -	" 113 = +++	" 137 = -
" 90 = -	" 114 = -	" 138 = -
" 91 = +-	" 115 = ++	" 139 = -
" 92 = -	" 116 = -	" 140 = -
" 93 = -	" 117 = -	" 141 = -
" 94 = +	" 118 = -	" 142 = -
" 95 = -	" 119 = -	" 143 = -
" 96 = ++	" 120 = -	" 144 = -
" 97 = +	" 121 = -	" 145 = -
" 98 = +++	" 122 = ++	" 146 = -
" 99 = +++	" 123 = -	" 147 = -

Continuación Tabla No. 1

I	Anticuerpos	I	Anticuerpos	I	Anticuerpos	I
I	Cis 148 = -	I	Cis 173 = -	I	Cis 198 = -	I
I	" 149 = -	I	" 174 = -	I	" 199 = -	I
I	" 150 = +++	I	" 175 = -	I	" 200 = -	I
I	" 151 = ++	I	" 176 = +++	I	" 201 = -	I
I	" 152 = -	I	" 177 = -	I	" 202 = -	I
I	" 153 = -	I	" 178 = -	I	" 203 = -	I
I	" 154 = -	I	" 179 = -	I	" 204 = -	I
I	" 155 = -	I	" 180 = -	I	" 205 = -	I
I	" 156 = ++	I	" 181 = -	I	" 206 = -	I
I	" 157 = -	I	" 182 = -	I	" 207 = -	I
I	" 158 = -	I	" 183 = -	I	" 208 = -	I
I	" 159 = -	I	" 184 = -	I	" 209 = -	I
I	" 160 = -	I	" 185 = -	I	" 210 = -	I
I	" 161 = -	I	" 186 = -	I	" 211 = -	I
I	" 162 = -	I	" 187 = -	I		I
I	" 163 = -	I	" 188 = -	I		I
I	" 164 = -	I	" 189 = -	I		I
I	" 165 = +++	I	" 190 = -	I		I
I	" 166 = +++	I	" 191 = -	I		I
I	" 167 = -	I	" 192 = -	I		I
I	" 168 = -	I	" 193 = -	I		I
I	" 169 = -	I	" 194 = -	I		I
I	" 170 = -	I	" 195 = -	I		I
I	" 171 = -	I	" 196 = -	I		I
I		I	" 197 = -	I		I
I		I		I		I

SEGUNDO INMUNODOTT

Tabla No. 2

Anticuerpos	Anticuerpos	Anticuerpos
Cis 1 = ++	Cis 51 = 1	Cis 100 = +-
" 6 = +++	" 52 = ++	" 101 = +
" 7 = +++	" 61 = +++	" 102 = +++
" 8 = +++	" 70 = ++	" 104 = +++
" 13 = +++	" 74 = -	" 113 = +++
" 14 = +++	" 78 = +++	" 122 = ++
" 17 = +++	" 81 = ++	" 151 = ++
" 30 = +	" 85 = -	" 152 = +
" 35 = +	" 87 = ++	" 165 = ++
" 37 = +	" 91 = -	" 166 = +++
" 41 = +-	" 95 = +++	
" 43 = +++	" 98 = ++	
" 51 = ++	" 101 = +++	

TERCER INMUNODOTT

Tabla No. 3

ANTICUERPOS	ANTIGENOS DE CISTICERCO			
	VI-89	VIII-89	VIII-89	CEREBRO L. 1-7
Cis 1	-	+	+++	-
" 6	+++	+	+-	-
" 7	+++	-	++	-
" 8	++	+-	-	-
" 13	+-	-	+	-
" 14	+	++	-	-
" 17	+	++	+	-
" 30	+	+	++	-
" 35	++	+++	++	+
" 37	++	+	++	-
" 41	+++	+	-	-
" 43	+++	-	-	-
" 50	+	+	+	-
" 52	-	-	-	-
" 61	++	-	++	-
" 71	-	-	-	-
" 78	-	++	-	-
" 82	+-	-	-	-
" 91	+++	+++	-	-
" 101	++	++	-	-

NOTA: A partir de Cis-52 los sobrenadantes fueron mantenidos en nevera durante una semana, observándose una baja en la reactividad.

5.- Pruebas de los Hibridomas

Se descongelaron varios viales de células híbridas y se cultivaron.

Utilizando el antígeno crudo en inmunodot se probaron hibridomas con el objeto de apreciar tanto reactividad como especificidad.

Los sobrenadantes que presentaron una mayor reactividad fueron Cis 1, 3, 14, 30, 35, 41, 50, 52, 78, 96 y 104.

Se clonan Cis 14, 30 y 52, los mismos que al multiplicarse y efectuar las pruebas por dot se decide mantener los clones 14.2, 14.3 y 14.10 - 30.3, y 30.7 - 35.2; y 78.2.

Los sobrenadantes y clones antes mencionados se los sometió a inmunoblotting, utilizando como antígeno extracto crudo de cisticercos, cerebro y músculo estriado de cerdo.

Como resultado de esta prueba se obtiene que los sobrenadantes Cis 1, 30, 52 y el clono 14.10 presentan tres bandas de diferentes pesos moleculares sin existir coincidencia de bandas entre los mismos. Cis 35, 96 y el clono 14.3 dos bandas no coincidentes. Cis 78 fue el que más bandas presentó, un total de ocho.

Al repetir por varias veces el inmunoblotting no se logró reproducibilidad en los resultados de los sobrenadantes.

Otra de las pruebas que se efectuó fue la de ELISA por el método de competencia y sandwich. Para dichos propósitos, se utilizaron como antígenos extractos crudos de cisticercos en dilución 1/10, de igual manera que cerebro y músculo estriado de cerdo. Se probaron tanto los sobrenadantes como los clones y como control positivo suero de ratón inmunizado (SR25) y como control negativo sobrenadante de mieloma (p3/653); todos estos como primer anticuerpo.

Los resultados demostraron que Cis 14.3, Cis 30.7 y Cis 35.2 presentaron buena reactividad frente al extracto crudo, por lo que se decidió mantenerlos en multiplicación.

Al efectuar el ELISA por competencia, enfrentando los sobrenadantes o los clones en competencia con suero de ratón inmunizado por Cisticercosis mediante ELISA sandwich, en diferentes diluciones (1/10, 1/20, 1/40, etc) se aprecia por los resultados que no había competencia.

Con el objeto de probar especificidad de estas células productoras de anticuerpos se realizó ELISA sandwich pegando en la placa albúmina como antígeno y como primer anticuerpo nuestras selecciones. Como resultado se obtuvo que Cis 35.2 y 44.3 dieron positividad a esta prueba mientras que Cis 30.7 no desarrolló color.

Por estas razones se concluyó que los clones positivos por este screening son productos de anticuerpos específicos contra albúmina y no para antígeno específico del cisticerco; de la misma forma, el clono negativo reconoce algún epítipo en el extracto crudo de cisticerco pero no el mismo epítipo que reconoce el suero del paciente, por lo que no existe la inhibición. Estos resultados obligan a nuevos ensayos y por lo tanto no tenemos un hibridoma con características aceptables para el escalinamiento.

CONSULTA BIBLIOGRAFICA

- 1.- Anónimo: Cisticercosis cerebral. Revista informativa del Ministerio de Salud Pública, Quito. 3.17.1982
- 2.- Brown, Harold: Parasitología Clínica. Edit. Interamer. 3 Edic. 196-200.1970.
- 3.- Carpio, A; Palacios, M; Quezada, A; Diagnóstico de Cisticercosis por inmunofluorescencia. Revista Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Vol2, No 1, pag 54, 1987.
- 4.- Erazo, F; Alvarez, J; Prevalencia y Seguimiento Epidemiológico de la Teniasis y Cisticercosis; Informe Universidad de Guayaquil; 1986.
- 5.- Flisser, A; Tanab, R; Landde, C; Inmunolectroforesis y doble inmunodifusión en el diagnóstico de Cisticercosis cerebral humana; Arch. Inv. Médica 6; 1-12, 1975.
- 6.- Jones, A: Introduction to Parasitology; Addison Wesley Series in life science; pag 144-166; 1967.
- 7.- Kagan, I: Serodiagnosis of parasitic diseases. Manual of Clinical Microbiology, Third Edition, pag 724-750; 1980.
- 8.- Kohler, G. and Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 256: 495-497; 1974.
- 9.- Lane, D. and Koprowski, H Molecular recognition and the future of monoclonal antibodies. Nature 296: 200-202; 1982.
- 10.- Lazo, R: Zoonosis por helmintos en animales domésticos; Rev. Ecuat. Hig. Med. Trop: 25, pag 95-113; 1968.
- 11.- Nossal, G.J.L. and Lederberg, J. Antibody production by single cells. Nature 181: 1419-1421; 1958.
- 12.- Palacios, M; Quimi, E; Martinez, J: La inmunolectroforesis en el diagnóstico de 60 casos de Cisticercosis Humana. Rev. Ecuat. Hig. Med. Trop. Vol. 35-No 1, pag 3-18. 1985
- 13.- Gavilondo, E.J: Manual teórico-práctico sobre tecnología de obtención y producción de anticuerpos monoclonales murinos. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Cuba 1988.

- 14.- WHO: manual de curso internacional de Biotecnología para investigación y diagnóstico de enfermedades infecciosas/89.
- 15.- Pillemer, E. and Weissman, I. A monoclonal antibody that detects a VK-TEPC-15 idiotypic determinant cross reactive with a Thy-1 determinant. J. Exp. Med. 153: 1068-1079; 1981.
- 16.- Rosas, N; Sotelo, J; Nieto, D: ELISA in the diagnosis of Neurocysticercosis; Arch. Neurology Vol 43: 353-356; 1986.
- 17.- Sotelo, J; Guerrero, V; Rubio, F: Neurocysticercosis; A new classification based in active and inactive forms. A study of 753 cases. Arch. Intern. Med; Vol 145 pag 442-445; 1985.
- 18.- Spencer, H; et al: Tropical Pathology; Springer-Verlag; pag 426-436; 1973.

C E R D O

CANTIDAD: g. _____ ml. _____
LUGAR DE RECOLECCION: PROVINCIA: _____ CANTON _____ LUGAR _____
PROCEDENCIA: _____
LUGAR ANATOMICO DE LA MUESTRA: _____
GRADO DE INFESTACION MACROSCOPICA: _____

C E R D O

CANTIDAD: g. _____ ml. _____
LUGAR DE RECOLECCION: PROVINCIA: _____ CANTON _____ LUGAR _____
PROCEDENCIA: _____
LUGAR ANATOMICO DE LA MUESTRA: _____
GRADO DE INFESTACION MACROSCOPICA: _____

F I C H A

Suero/LCR

Muestra enviada por _____

Nº _____

APELLIDOS Y NOMBRES: _____

SEXO:

M

F

EDAD: _____

PROCEDENCIA: PROVINCIA _____ CANTON _____ LUGAR _____

LUGAR y FECHA DE NACIMIENTO: _____

LUGAR DONDE RESIDIO LOS CINCO ULTIMOS AÑOS: _____

HABITOS ALIMENTICIOS: _____

DATOS CLINICOS:

1. SIGNOS y SINTOMAS NEUROLOGICOS

- a. Ceguera
- b. Epilepsia
- c. Cefaleas
- d. Hipertensión intracraneal
- e. Disturbios mentales
- f. Disturbios visuales o auditivos
- g. Meningitis crónica
- h. Paresia
- i. Paraplegia
- j. Hemorragia cerebral
- k. Hematoma cerebral
- l. Trombosis cerebral

2. ENFERMEDADES PARASITARIAS

- a. Echinococosis
- b. Hidatidosis
- c. Strongiloidiasis
- d. Trichinosis
- e. Filariasis
- f. Larvas viscerales migratorias
- g. Criptococosis
- h. Otros

3. CONFIRMADAS POR:

- a. Cirugía
- b. Autopsia
- c. Biopsia
- d. Tomografía axial computarizada: -Hidrocéfalo
-Imágenes quísticas
-Calcificaciones intraparenquimatosas
-Tumores
-Otros
- e. Diagnóstico Clínico

4. IMPRESION DIAGNOSTICA: _____

5. DIAGNOSTICO DEFINITIVO: _____

DIAPPOSITIVAS

- 1.- Carne de cerdo infestada con quistes de Cisticerco.
- 2.- Detección de Antígenos presentes en extractos de Quistes de Cisticerco. Se ha utilizado técnica de Inmunodot.
- 3.- Separación de componentes antigénicos de Quistes de Cisticercos en geles de poliacrilamida, por electroforesis.
- 4.- Obtención de pesos moleculares de los diferentes componentes antigénicos presentes en Quistes de Cisticercos comparados con el patrón.