

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①① Número de publicación: **2 119 674**

②① Número de solicitud: 9600230

⑤① Int. Cl.⁶: G01N 33/543

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **01.02.96**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.98**

Fecha de concesión: **31.03.99**

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.05.99**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.05.99

⑦③ Titular/es: **Universidad de Granada
C/ Santa Lucía, 2 - 2ª planta
18071 Granada, ES**

⑦② Inventor/es: **Younes, Sbihi y
Osuna Carrillo de Albornoz, Antonio**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Desarrollo de un "Kit" rápido para el diagnóstico de la Hidatidosis.**

⑤⑦ Resumen:

La presente invención consiste en el desarrollo de un "Kit" rápido de diagnóstico de la Hidatidosis, capaz de detectar la presencia de anticuerpos específicos frente a la parasitación por la larva de *Echinococcus*. El Kit basado en una inmunocromatografía donde existe una banda reactiva sobre un sustrato inerte, capaz de retener los inmunocomplejos formados con los antígenos del parásito. Como reactivos biológicos, pueden emplearse sangre, suero, como fluidos biológicos.

Este "Kit" puede aplicarse a la detección de anticuerpos así como para la detección de sustancias capaces de comportarse como antígenos. Este "Kit" discrimina los casos positivos de los negativos, apareciendo una banda coloreada sobre un sustrato inerte en los casos positivos.

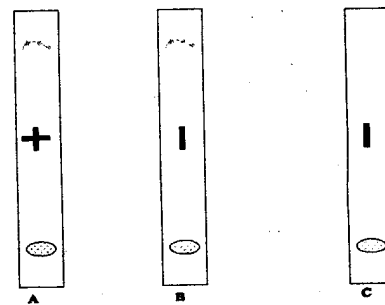


Fig. 1

ES 2 119 674 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Desarrollo de un "Kit" rápido para el diagnóstico de la Hidatidosis.

5 **Objeto de la invención.**

Consiste en el desarrollo de un "Kit" rápido para el diagnóstico de la hidatidosis, basado en la de-
tección de anticuerpos específicos. Esta enfermedad producida por el verme *Echinococcus granulosus*, es
una zoonosis ampliamente distribuida por todo el planeta. Este "Kit" discrimina los casos positivos de
10 los negativos de un modo fácil de interpretar, por la formación de una cruz coloreada sobre un sustrato
inerte en los casos positivos. Para su realización puede partirse de muestras de sangre, suero, saliva, u
otros fluidos orgánicos.

15 **Antecedentes.**

La Hidatidosis es una zoonosis ampliamente distribuida por todo el planeta, con especial relevancia
en las zonas ganaderas, cuyo agente etiológico es *Echinococcus granulosus* (Rudolphi, 1801), un pequeño
cestode, cuya fase adulta se desarrolla en el duodeno y yeyuno de cánidos. En su ciclo biológico, los hue-
20 Al ser ingeridos por animales omnívoros, liberan en el duodeno la larva hexacanta que contienen, la cual
tras atravesar la pared intestinal llega por vía sistémica a distintos órganos donde se desarrolla hasta me-
tacestode o hidátide. Este, a veces de gran tamaño, aparece rodeado de tres capas: una externa o capa
adventicia, formada por el hospedador, una capa laminada acelular, y una germinativa que da origen a
los protoescólices, el interior está ocupado por el líquido hidatídico. La hidatidosis puede producir quistes
25 hijos por gemación tanto endógena como exógena.

Al ser ingeridos los protoescólices por los cánidos, se desenvaginan, y se fijan en el duodeno donde
evolucionan segmentándose, dando el estróbilo a los aproximadamente ventiocho días un último anillo
repleto de huevos, con lo que se cierra el ciclo biológico. La hidatidosis causa cuantiosos daños, tanto a la
30 ganadería como al hombre. Los mayores niveles de parasitación, tanto humano como animal aparecen en
las zonas ganaderas del planeta como Australia, Argentina, Chile, Río Grande del Sur (Brasil) y Uruguay.
En otras zonas del planeta, con niveles socioeconómicos y culturales bajos como Medio Oriente, Irán,
Irak, Líbano, Turquía, Marruecos, Túnez, Libia, y Argelia los niveles de parasitación alcanzan valores
elevadísimos. Thompson y Sinyth (1.975)¹ evaluaron las pérdidas, sólo por decomisos en la ganadería
35 del Reino Unidos, donde la enfermedad no alcanza los niveles de otros países, en una 700.000 Libras
esterlinas al año. En Australia, Cumaratilake y Thopmson (1.982)² estimaron las pérdidas en 12 millones
de dólares. En Chile las pérdidas alcanzan en la economía local unos 5 millones de dólares³.

La hidatidosis en el hombre (y demás hospedadores intermediarios) es una enfermedad parasitaria con
40 diversas manifestaciones en cuanto a la patología y sintomatología, dependen de la localización anatómica
del quiste. Schantz en 1.972⁽⁴⁾, determina tras el estudio de 30.000 pacientes, como en el 60 % de los
casos la localización del quiste es hepática, en un 10 % pulmonar, y el 20 % restante presenta una loca-
lización repartida por el resto del organismo. Dévé en 1.949⁽⁵⁾, observó cómo las oncosferas a través de
45 las microvellosidades intestinales penetran en la circulación portal llegando al hígado, pero también vio
cómo otras, a través de vénulas y circulación linfática pasan al corazón, a partir del cual son diseminadas
por el cuerpo, presentando, finalmente localizaciones "ectópicas" tales como riñón, bazo, e incluso ojo.

La aparición de síntomas varía según la localización final del quiste, si se localiza en la cabeza por
ejemplo dado que el cráneo es una cavidad inextensible, los síntomas aparecerán más rápidamente que si
50 se localiza en la región abdominal. En ésta la sintomatología sólo comienza a aparecer cuando el tamaño
del quiste entra en conflicto con algún órgano.

Inmunología de la hidatidosis: Cualquier hospedador intermediario incluido el hombre, cuando está para-
sitado con la larva o hidátide de *Echinococcus granulosus*, se encuentra expuesto a una gran variedad de
55 determinantes antigénicos derivados del parásito, o bien a moléculas propias del hospedador modificadas
por el verme. Estos determinantes antigénicos producen fenómenos de inmunoestimulación que pueden
ser de gran importancia para el diagnóstico inmunológico de la parasitación. Al igual que en la mayor
parte de las enfermedades parasitarias, la relación parásito-hospedador y especialmente los mecanismos
de supervivencia y evasión de la respuesta inmune, no son del todo conocidos. Parece demostrada, la exis-
60 tencia de diferentes cepas del parásito, capaces de desarrollarse en distintos hospedadores intermediarios⁶.
Por otra parte, Kroece y Taner (1.977)⁷ estudiaron, la diferente susceptibilidad que muestran los hos-
pedadores, en función de la relación inmunológica al parásito, llegando a la conclusión de que existe un

control genético por parte del mismo, del que depende la susceptibilidad/resistencia.

Respuesta celular: La respuesta celular del hospedador a la echinococosis, fue revisada por Smyth y Heath (1.970)⁸, Ali-Khan y cols. (1983)⁹, describen la patología de un órgano, experimentalmente infectado pudiendo, diferenciar si la invasión se ha realizado por oncosferas, o como consecuencia de una hidatidosis secundaria. Alrededor de las oncosferas, aparece una necrosis celular, junto con un infiltrado de neutrófilos y macrófagos en un área más lejana, antes de desarrollarse la capa laminada. En la echinococosis secundaria los pequeños quistes, siempre que se trasplanten con la capa adventicia, aparecen rodeados de macrófagos, eosinófilos y neutrófilos. Baron y Taner (1.977)¹⁰ encuentran, que los macrófagos activados se adhieren al parásito, mientras los no activados degeneran y mueren. Heath (1.970, 1.973)¹¹, encuentra que los quistes de *E. granulosus* desarrollados en ovejas, después de un mes de haber sido infectadas con huevos, aparecen rodeados por una zona necrótica entre la capa laminada y la reacción inflamatoria del huésped, sugiriendo que una serie de factores tóxicos deben ser liberados por el pequeño quiste.

Las sustancias mitogénicas son de origen parasitario, pues los protoescolices obtenidos de infecciones experimentales en ratones Balb/c son mitógenos para los linfocitos singénicos. La estimulación linfocitaria afecta a las poblaciones celulares B y T y parece ser macrófago-dependientes, restringida por los antígenos HLA de clase II en el caso de los linfocitos T, e independiente de células accesorias y policlonal en el caso de los linfocitos B, con aparición de anticuerpos que reaccionan con antígenos no relacionados con *E. granulosus*¹².

Respuesta humoral inespecífica: Debido a la estimulación antigénica prolongada a la activación policlonal inespecífica de los linfocitos B, y a la respuesta humoral específica, pueden detectarse niveles elevados de inmunocomplejos circulantes, factores reumatoides frente a diferentes isotipos de inmunoglobulinas, anticuerpos anti-Fab y otros autoanticuerpos^{14,15}. Los pacientes infectados por hidátides presentan generalmente títulos elevados de anticuerpos específicos frente al parásito. En esta respuesta humoral predominan los anticuerpos de la clase IgG, pero también se detectan IgM, IgA e IgE¹³.

Respuesta humoral específica: La respuesta humoral específica en los pacientes con quiste hidatídico es muy variada y depende de factores tan dispares como la complejidad antigénica de *E. granulosus*, la localización de los quistes (son menos inmunogénos los quistes de localización pulmonar o cerebral), la edad y el estado de los quistes (los quistes fisurados y complicados son más inmunogénos que los hialinos o calcificados)¹⁶. Utilizando métodos de diagnóstico por inmunotransferencia, pueden detectarse anticuerpos frente a más de 40 componentes antigénicos de distintos pesos moleculares, siendo los antígenos más inmunoreactivos los denominados 5 y B^{17,18}.

Los anticuerpos más abundantes son IgG. La detección de anticuerpos de clase IgM o IgA sugiere la existencia de quistes biológicamente activos, pero su detección es muy poco constante aunque se utilicen métodos de elevada sensibilidad. Así se detectan anticuerpos de clase IgM, utilizando técnicas de micro-ELISA, sólo en el 21 a 24 % de los pacientes con quistes viables¹⁹. La respuesta mediada por IgE puede detectarse por radioinmunolectroforesis²⁰, radioinmunoanálisis (RAST)³⁶, ELISA²¹, o por degradación de basófilos. Aunque estos anticuerpos IgE se producen frente a los dos complejos antigénicos mayores, el aptígeno-5, es el más inmunógeno, y su detección apoda un diagnóstico de hidatidosis de elevada especificidad²².

Diagnóstico de la hidatidosis: hay cuatro razones fundamentales por las que la hidatidosis se diagnostica en sus últimos estadios. En muchas ocasiones se detecta cuando el quiste alcanza grandes dimensiones dificultando el funcionamiento normal del organismo. En la mayoría de los casos sólo se observan fenómenos alérgicos y eosinofilia. A veces se detecta cuando se produce la rotura traumática del quiste que se refleja en un "schok" anafiláctico. En otras ocasiones se detecta accidentalmente en el transcurso de un examen radiológico rutinario, o por otras circunstancias. Las pruebas físicas para el diagnóstico de la hidatidosis (TAC, ecografía), aportan datos precisos sobre la localización anatómica del quiste²⁵, pero obviamente no discriminan entre hidatidosis y otras patologías quísticas o tumorales²⁶. El diagnóstico inmunológico es la prueba confirmatoria de la etiología del proceso, imprescindible para un diagnóstico definitivo previo a una intervención quirúrgica.

El diagnóstico inmunológico de la hidatidosis puede realizarse mediante, detección de anticuerpos de clase IgE, de clase IgG o IgM, detección de antígenos parasitarios circulantes, y mediante la detección de inmunocomplejos circulantes.

Detección de anticuerpos de clase IgE:

La elevación de las tasas séricas de IgE es característica de parasitosis provocadas por *Ascaris lumbricoides*, *Toxocara canis*, *Cappillaria philippensis*, *Schistosoma app.*, y *E. granulosus*. La elevación de los niveles séricos de IgE se correlaciona con la aparición de IgE específicas. No existe correlación entre los títulos de IgE anti-Echinococcus y los títulos de otras inmunoglobulinas. La respuesta IgE se desencadena frente a vanos componentes antigénicos de *E. granulosus*, siendo el antígeno-5 el que más estimula la respuesta IgE.

Existen varias pruebas basadas en la detección de IgE:

*Intradermorreacción de Casoni*²⁷; *Cuantificación de la tasa de IgE total*¹⁷; *Detección de IgE sérica específica*¹³; *Degranulación de basófilos humanos*²¹

Detección de anticuerpos de clases IgG o IgM

Las pruebas basadas en su detección son: *Fijación de complemento*²⁸; *Inmunofluorescencia indirecta (IFI)*²⁹; *Métodos de precipitación*³⁰; *Inmunolectroforesis*^{31,32,33}; *Doble difusión*¹⁵; *Aglutinación de partículas de látex*^{34,35}; *Hemaglutinación indirecta*^{29,30}; *Radioinmunoanálisis*³⁶, y *Enzimoimmunoanálisis (ELISA)*^{29,35,37}.

En esta última prueba el antígeno, (líquido hidatídico crudo o extracto purificado) se une a una fase sólida. Se incuba con las muestras de suero y la reacción antígeno-anticuerpo se evidencia con una antiinmunoglobulina humana marcada con una enzima y un substrato cromogénico.

La ELISA se caracteriza por su gran sensibilidad, que varía según las series: 97%³⁷, 83%³⁵, 80%²⁹. Generalmente, tanto la especificidad como la sensibilidad dependen de la naturaleza del antígeno utilizado para sensibilizar la placa (fase sólida).

El líquido hidatídico crudo contiene proteínas procedentes del hospedador y existe una gran heterogeneidad entre el contenido antigénico en los diferentes quistes, por lo que la normalización del extracto antigénico es difícil. Por este motivo, se han desarrollado pruebas de ELISA que utilizan fracciones antigénicas procedentes de la fase larvaria.

Si en lugar de utilizar plástico como fase sólida se emplean membranas de nitrocelulosa (Dot-ELISA) los resultados son semejantes a los obtenidos en micro-placa, pero con ahorro de tiempo y reactivos³⁷. Los sistemas amplificadores tipo biotina-avidina mejoran ligeramente la sensibilidad pero aumentan la tasa de falsos positivos¹⁶.

Inmunotransferencia: Esta prueba combina el poder de resolución de la electroforesis en gradiente de poliacrilamida con SDS(SDS-PAGE) con la sensibilidad del ELISA, para lograr una técnica de máxima resolución cualitativa en el estudio de los antígenos de *E. granulosus* y de la respuesta serológica. Se basa en una separación electroforética, por SDS-PAGE de los antígenos de *E. granulosus*, posterior transferencia de los antígenos a membranas de nitrocelulosa e identificación por métodos inmunoenzimáticos³⁸. El SDS-PAGE ha sido utilizado para caracterizar los antígenos mayores de *E. granulosus*³⁹ y estudiar las reacciones cruzadas^{23,24,40}.

El líquido hidatídico examinado por SDS-PAGE sin reducción previa del antígeno y posterior inmunotransferencia, muestra bandas en unos límites entre más de 200 kD hasta menos de 14 kD, con un claro predominio de un complejo de 52-62 kD que desencadena una fuerte respuesta inmunológica en los pacientes afectados de hidatidosis y cisticercosis, y que parece estar relacionado con el antígeno-5⁴¹.

Las respuestas de mayor especificidad son: a) banda de reacción inmunoenzimática. con proteína de 8 kD; sensibilidad del 86% y especificidad del 100% en infecciones por *E. granulosus* o *E. vogeli*⁴¹, y b) bandas de reacción inmunoenzimática con proteínas de 12, 16,23 kD⁴⁰.

Los antígenos utilizados en esta metodología suelen ser líquidos hidatídicos de diversas procedencias, pero también pueden utilizarse antígenos procedentes de otros cestodos como *Taenia hidatigena*, que permiten el diagnóstico diferencial entre hidatidosis y cisticercosis sin depender de la provisión de líquido hidatídico.

Detección de antígenos circulantes: El desarrollo de una metodología capaz de detectar la presencia de antígenos circulantes permite aumentar la sensibilidad global de los métodos inmunológicos para el diagnóstico de la hidatidosis y, el hallazgo de antígenos secretados aporta además un dato fiable sobre la actividad del quiste⁴². Con un ELISA tipo sandwich con doble anticuerpo pueden detectarse antigenemias mínimas de alrededor de 270 ng/ml. La presencia de antígenos circulantes se asocia a la fisuración del quiste, mientras que los quistes intactos liberan poco o ningún antígeno¹⁵.

Detección de inmunocomplejos circulantes: La detección de inmunocomplejos circulantes complementa el diagnóstico inmunológico de la hidatidosis, sobre todo si se acompaña de la detección de antígenos parasitarios formando parte de los inmunocomplejos^{43,44}.

Cualquier clase de anticuerpo puede formar parte de los inmunocomplejos, pero la presencia de IgM sugiere la existencia de un quiste fisurado y en actividad. La presencia de IgA es más frecuente en los quistes fisurados de localización pulmonar⁴³.

Los inmunocomplejos pueden detectarse tras su precipitación con polietilenglicol y cuantificarse por espectrofotometría. Se detectan en el 42% de los casos en general; en un 70% de ellos el quiste está fisurado y en el 33% no lo está¹⁶. Estos inmunocomplejos pueden proceder también de la respuesta antiidiotipo o de la presencia de factores reumatoides. En tales casos, pueden no detectarse antígenos parasitarios formando parte del inmunocomplejo, aunque también su presencia se correlaciona con la actividad de la enfermedad¹⁵.

De todas las pruebas inmunológicas clásicas, las que más precozmente se negativizan después de la curación son la fijación del complemento y la inmunofluorescencia indirecta, pero los resultados son muy variables y en diferentes revisiones se obtienen resultados positivos con cualquier técnica clásica incluso después de haber transcurrido 10 años de la extirpación del quiste.

La detección de IgM específica frente a los antígenos de *E.granulosus*, constituye un marcador fiable de la actividad del parásito, pero se detecta sólo en pocos casos e incluso se han descrito algunos con IgM positiva en pacientes libres de la larva durante más de 10 años¹⁹.

No todas las metodologías están al alcance de todos los laboratorios de diagnóstico clínico, por lo que se recomienda para un diagnóstico inmunológico fiable, utilizar una prueba de elevada sensibilidad, como es el caso de la hemaglutinación indirecta, para pacientes con títulos bajos pero significativos, y una prueba para confirmación que sea de máxima especificidad, como son las pruebas de precipitación en gel o de aglutinación de partículas de látex³⁵.

En los laboratorios con mayores posibilidades, se pueden adicionar otras pruebas de confirmación como la degranulación de basófilos humanos o la inmunotransferencia. De todas formas, aún en este caso, un porcentaje de pacientes, sobre todo aquellos afectados de hidatidosis pulmonar ofrecen resultados negativos, y no pueden ser correctamente diagnosticadas.

Referencias.

1. Thompson y Smyth. (1975) Vet. Parasitol. 1: 107-127.
2. Cumaratilake y Thopmson. (1982) Helmentol. Abs. 51: 233-252.
3. Neghme y Silva. (1970) Rev. Med. Brasil 16: 279-286.
4. Schantz PM. (1972) Bol. Ofic. Sant. Panamericano 63: 198-202.
5. Dévé F. (1949) Paris: Masson.
6. Thopmson y col. (1977) Helmentol. Abs. 46: 837-861.
7. Kroece y Taner. (1977) Int. J. for Parasitol. 170: 873-883.
8. Smyth y Heath. (1970) Helmentol. Abs. 39: 1-23.
9. Ali-Khan y cols. (1983) American Trop. Med. Parasitol. 77: 497-512).

ES 2 119 674 B1

10. Baron y Taner. (1977) *Int. J. for Parasitol.* 7: 489-495.
11. Heath. (1970 y 1973) Phd Tesis Universidad de Camberra Australia y Prociding of simposium Med. Asociation Australia.
- 5 12. Cox DA y col. (1986) *Immunology* 57: 461.
13. Abril MJ. (1988) *Allergol. Immunopathol.* 16:49-52.
- 10 14. Cox DA y col. (1989) *Immunology* 67: 16-20.
15. D'Amelio R y col. (1989) *Med. Microbiol. Immunol.* 178:177-186.
16. Zhanqing SH. (1988) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39: 93-96.
- 15 17. Larrand L y col. (1984) *Allergol. Immunopathol.* 12: 199-206.
18. Henrique B. (1990) *Basic Research in Helminthiases*, Edited by R-Ehrlich, A. Nieto and L. Yarzábal. pp: 189-201.
- 20 19. Tassi C y col. (1984) *Boll. Ist. Sieroter Milan* 63(2): 140-144.
20. YarLabal LA y col. (1977) *J. Parasitol.* 63: 495-499.
- 25 21. Leynadier F y col. (1990) *Br. Med. J.* 280: 1251-1252.
22. Cesbron JY. (1986) *Gastroenterol. Clin. Biol.* 10: 415-418.
23. Valera-Díaz VM. (1978) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 554-557.
- 30 24. Kanwar J.R y col. (1992) *J. Med. Microbiol.* 36:46-51.
25. Mac Pherson CNL. (1987) *Lancet* 2:259-261.
- 35 26. Hugier M y col. (1987) *Dig. Dis. Sci.* 32:1354-1357.
27. Conder GA y col. (1980) *J. Parasitol.* 66: 577-584.
28. Kagan IG y col. (1966) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 10: 727-732.
- 40 29. Matossian RM y col. (1979) *J. Helmintol* 53: 287-291.
30. Williams JF y col. (1971) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20: 575-579.
- 45 31. Calderón C. (1977) *Rev. Med. Chil.* 105: 460-463.
32. Valera-Díaz VM y col. (1975) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24: 312-319.
33. Valera-Díaz VM y col. (1975) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24(2):248-303.
- 50 34. Tassi C y col. (1981) *Int. J. Parasitol.* 11: 85-88.
35. Barbieri M y col. (1993) *Inter. J. Parasitol* 23(5): 565-572.
- 55 36. Falagiani P y col. (1979) *Folia Allergol. Immunol. Clin.* 26: 243-248.
37. Rogan MT y col. (1991) *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85: 773-777.
38. Verastigui M y col. (1992) *J. Clin. Microbiol.* June: 1557-1561.
- 60 39. Piantelli M y col. (1977) *J. Immunol* 119: 1382-1386.

40. Leggatt GR y McManus DP. (1994) *Parasite Immunol* 16: 87-96.
41. Maddison SE y col. (1989) *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 40:337-383.
- 5 42. Liu D y col. (1993) *Parasitolgy* 106: 75-81.
43. Craig PS. (1986) *Parasite Immunol* 8: 171-188.
44. Rosario Bonifacino y col. (1993) *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87: 97-102.

10 **Explicación de la invención.**

La invención consiste en el desarrollo de un kit para un diagnóstico rápido, (no más de algunos minutos), de la hidatidosis. Es además aplicable a la detección de cualquier otro proceso infeccioso, o a la determinación de sustancias con capacidad antigénica. El método se basa en la sensibilización de partículas de metales en estado coloidal, con antígenos o con anticuerpos específicos. Es válido pues, tanto para la determinación de anticuerpos específicos, como para la de antígenos en suero, sangre u otros fluidos biológicos. Los metales coloidales sensibilizados van sobre un soporte inerte, en el que se coloca, el fluido biológico, que se desplaza en él por capilaridad, arrastrando las partículas metálicas sensibilizadas, que se ligan específicamente a los anticuerpos ó a los antígenos. A un nivel determinado, se ha situado un sistema "trampa" que atrapa a las partículas impidiéndoles continuar su desplazamiento si la reacción es positiva, lo que puede visualizarse por su color, o por cualquier otro método (colorimétrico, o espectrofotométrico). Esta "trampa" puede basarse en anticuerpos anti-antígeno, en un sistema de captura de anticuerpos, (proteína A ó proteína G), en un anticuerpo monoclonal, en su caso, o puede ser un antígeno si lo que se trata es de valorar inmunoglobulinas. Como medio de desarrollo puede emplearse cualquier solución que mantenga un pH entre 6 y 9, y que no altere los complejos antígeno-anticuerpo, formados. La evaluación de resultados se muestra en la figura nº 1, donde A refleja un resultado positivo, B negativo y C representa al soporte, antes de la aplicación del fluido biológico a examinar.

30 Este kit tiene una serie de ventajas sobre los procedimientos tradicionales de diagnóstico:

- Es una prueba de un solo paso
- El tiempo de realización es muy corto, no más de 5-10 minutos.
- 35 - No requiere operaciones filtrantes.
- No requiere fases de lavado, salvo que se parta de sangre como muestra biológico
- 40 - No requiere la determinación exacta del volumen de muestra a aplicar.
- Los resultados se analizan por una simple lectura visual

45 Ningún ensayo descrito anteriormente para el diagnóstico de la hidatidosis, presenta todas estas ventajas, combinadas en el mismo sistema analítico.

Descripción.

50 Se utiliza una lámina, de unos 4-5 centímetros de largo por 0'7 de ancho. Esta lámina puede ser de papel de nitrocelulosa, acetato de celulosa, o de cualquier otro material inerte capaz de unir proteínas, y permitir por capilaridad el desplazamiento de un fluido, con un flujo de 1'5 a 2 centímetros por minuto. Es útil por ejemplo, el tipo de membrana Nitro PB Plastic Backed Nitrocellulose, fabricada por Micron Separation INC. Sobre este soporte se aplican en un extremo, a unos 0'5 cms, las partículas de oro coloidal, de un tamaño comprendido entre 10 y 20 nm de diámetro y previamente conjugadas con el antígeno, ó con el sistema de captura específico que se vaya a utilizar. Aproximadamente en el centro de la membrana, se ha situado el sistema "trampa", en posición trasversal, para capturar por una reacción antígeno-anticuerpo a las partículas del conjugado metálico, impidiendo de esta forma que continúen en su desplazamiento.

60 En situación longitudinal al soporte, como control negativo, se adsorben partículas metálicas ligadas a una proteína incapaz de reaccionar. De este modo, la línea vertical va a aparecer en todos los casos y el signo "mas" (+) sólo cuando la reacción es positiva, y las partículas han quedado también retenidas

transversalmente por una reacción específica.

Preparación del conjugado metálico.

5 El oro coloidal es hidrofílico, y está formado por partículas de HAuCl_2 , manteniéndose la estabilidad del coloide por repulsión electrostática. La adición de electrolitos como el NaCl , induce la floculación de las partículas, formándose agregados. Esta floculación conlleva un cambio de color de rojo a azul, y puede evitarse estabilizando el coloide por adsorción de sustancias hidrofóbicas. Las partículas pueden adquirirse en Janssen Life Sciences Products, Olen, Bélgica. Previo a su sensibilización, se someten a un
10 proceso de reducción con citrato trisódico al 1% en solución acuosa. Después de ajustar el pH a 6, se procede a calcular la cantidad de reactivo bioselectivo, en ese caso proteína A, necesaria para estabilizar el coloide (E. Knecht, A. Martínez-Ramón, S. Grisolia- 1986 J. Histochem. Cytochem. 34:913-922).

15 Las partículas se centrifugan después a 60.000 g durante una hora, y a 4°C. Ello conduce a la formación de un precipitado de color rojo en el fondo del tubo, formado por el complejo proteína-oro coloidal, mientras que las partículas no estabilizadas aparecen adheridas a la pared del tubo, como una precipitación de color más oscuro. El botón se resuspende, en un volumen 25 veces inferior, en una solución formada por PBS 0'15M, con un 20% de glicerol y adicionado de 0'2mg/ml de polietilenglicol-20.000, y 20mM de azida sódica. Esta suspensión permanece estable durante varios meses a 4°C.

20 *Preparación del antígeno.*

Como antígeno, hemos empleado el complejo antigénico 5 y B, preparado según el método descrito por Rogan y col., 1990 (Clin. Exp. Immunol. 80: 225-231) basado en el método de Oriol et al. 1971
25 (Am. J. Trop. Med. Hyg. 20: 569-574) y Williams y col. 1971 (Am. J. Trop. Med. Hyg. 20:575-582).

Para su purificación hemos seguido los siguientes pasos:

- 1) Concentración del líquido hidatídico por diálisis en Polietilenglicol 20.000.
- 30 2) Diálisis del L.H frente a tampón acetato 0,005M pH 5 durante toda la noche.
- 3) Centrifugación del dializado a 50.000 g durante 30 min.
- 35 4) El precipitado se disuelve en tampón fosfato, 0,2M pH 8, hierviéndose en un baño durante 15 min.
- 5) Centrifugación a 50.000 g durante 60 min.
- 6) El botón se descarta, y el sobrenadante se pasa a través de una columna de proteína A-sepharosa para
40 remover y eliminar cualquier IgG contaminante. Al final se dializa frente a tampón fosfato salino pH 7,4. Esta fracción contiene mayoritariamente las subunidades de los antígenos B y 5.

45 Mediante la técnica de Oriol y col. (1971), cuando el líquido hidatídico se dializa, contra un tampón de baja fuerza iónica pH 5, la albúmina permanece en solución, mientras que los antígenos parasitarios y las euglobulinas precipitan. La fracción globulínica se elimina por precipitación, mientras que los componentes parasitarios mayoritariamente permanecen en solución.

Una vez preparado el antígeno, se procedió a su valoración, para el diagnóstico mediante inmunotransferencia (immunoblot), frente a sueros humanos procedentes, de pacientes con *E.granulosus* confirmados
50 quirúrgicamente, de pacientes con otras parasitosis, y de donantes sanos. Los resultados aparecen en la tabla 1.

55

60

TABLA 1

Sueros de pacientes con hidatidosis y controles ensayados por Inmunoblot frente a la fracción "AgB/5" purificada como se describió anteriormente.

Parasitosis (Nú. casos)	Número de sueros positivos AgB/5				
	P.M (Kd) de los polipeptidos				
	12-14	20	34	39	42
Hidatidosis (20)	19	19	19	18	16
Cisticercosis (4)	0	0	0	0	0
Toxoplasmosis (4)	0	0	0	0	0
Leishmaniosis (4)	0	0	0	0	0
Donantes sanos (6)	0	0	0	0	0

Como consecuencia de los resultados obtenidos, en que las bandas de peso molecular 12-14,20 y 34 Kd mostraron mayor sensibilidad que las de alto peso molecular, decidimos emplear las más sensibles purificandolas mediante cromatografía de exclusión molecular, en gel de Sephadex G-75 Superfine suministrado por Pharmacia, siguiendo el método descrito en el manual de Pharmacia (Gel filtration, Principles and Methods, 6 th edition. Oct. 1993).

Preparación de las tiras analíticas.

Como soporte analítico se puede emplear cualquier lámina inerte capaz de adsorber proteínas sobre su superficie, y que permita un flujo constante por humectación de una fase móvil acuosa, aplicada en uno de sus extremos. Se puede emplear una lámina de nitrocelulosa, acetato de celulosa o cualquier polímero que cumpla estas características. El soporte empleado en nuestros ensayos ha sido la membrana tipo Nitro PB Plastic Backed Nitrocellulose, fabricada por Micron Separation INC. Se utiliza en tiras de 0'7 centímetros de ancho y 4 a 5 centímetros de largo. Previo a su sensibilización, se aplica sobre ella, centrada y horizontal, una banda de 5 x 1 min, con una suspensión de partículas metálicas acopladas a una proteína no reactiva, como puede ser albúmina de huevo, altamente purificada.

La sensibilización se lleva a cabo con una solución de antígeno, preparado como se describió anteriormente aplicando transversalmente una banda similar a la anteriormente descrita con partículas metálicas, pero en posición transversa, y a unos 2'5 centímetros del margen de la membrana soporte, que se va a considerar como origen. Una vez el antígeno seco, se aplica sobre la membrana una solución de bloqueo durante 12 horas a 4°C. Esta puede ser una solución de polioxietilensorbitan monolaurato (Tween 20) al 0'3%, leche en polvo, gelatina al 0'4%, o cualquier otra solución de bloqueo de las, utilizadas en inmunotransferencia. Una vez bloqueado el soporte, se deja secar a temperatura ambiente. De este modo, finalizada la reacción, si ésta es negativa sólo va a haber una banda longitudinal, mientras que si ésta es positiva, el funcionamiento del sistema "trampa" va a conducir a una figura en forma de cruz, al darse tanto la reacción inespecífica como la específica. La suspensión del conjugado coloidal (3 a 5 μ l), se aplica a unos 0'5 centímetros del margen de la membrana. La tira reactiva está con ello disponible para llevar a cabo la reacción. Entre el extremo de la membrana y la zona que contiene las partículas metálicas, se aplica un rectángulo de papel, para absorber el fluido biológico que se va a utilizar.

Descripción del equipo que contiene la tira reactiva.

El sistema (Figuras 2 a 5), consta de un soporte de material plástico, para albergar la membrana analítica sensibilizada. En su parte superior existen tres ventanas, (Figuras 2, 3 y 4: A,B y C). En el origen, una ventana cuadrada de aproximadamente 0'5 cm de lado, (Figura 2:A), lugar de aplicación de la muestra biológica a analizar, que va a estar situada sobre el rectángulo de papel antes citado, y a la que denominaremos "ventana de aplicación". La segunda, (Fig 2:B), de un tamaño similar, se sitúa a unos 2 centímetros del origen. A través de ella podrá visualizarse la banda longitudinal que corresponde a las partículas unidas a la proteína no reactiva, caso de ser negativa la prueba, y dos bandas cruzadas en los casos positivos. Esta es pues la "ventana de visualización de resultado". La tercera, (Fig. 2:C), está situada a un centímetro de la anterior, y sirve para determinar el fin de la reacción, observando a

través de ella el paso de la fase móvil.

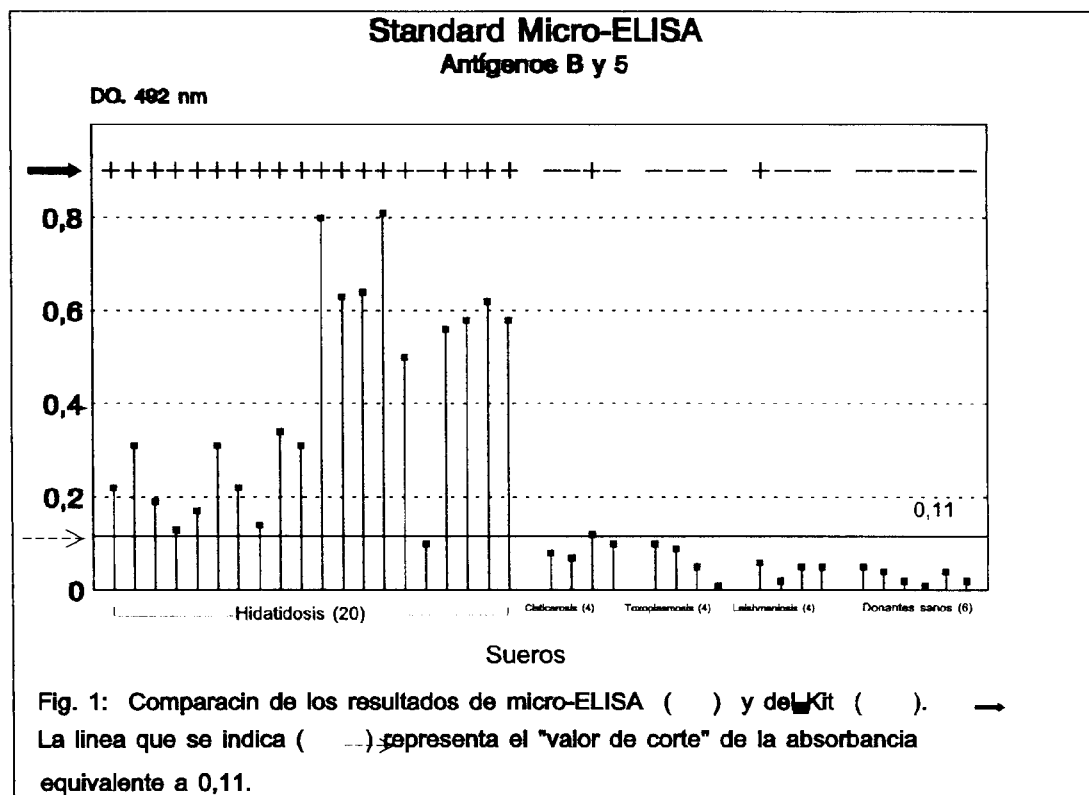
Cuando se utiliza como fluido biológico sangre, es necesario previo a la aplicación de la muestra, depositar unas gotas de una solución de heparina a través de la ventana A. Transcurrido el tiempo de desarrollo se aplicaran a través de la ventana B unas gotas de la solución oxidante que se describe posteriormente. Un minuto después, el equipo se introduce brevemente en el contenedor de transporte, y se vuelve a sacar. Este contenedor, (Figuras 4 y 5), es de plástico, tiene forma rectangular y posee unas guías longitudinales (Figuras 4 y 5:H), por las que se introduce el soporte de la tira reactiva. En la superficie interna de su cara frontal, se sitúan unas tiras de celulosa en fibras (Figuras 4 y 5, I), que, al introducir el soporte de la tira reactiva en el contenedor plástico, van a contactar con la ventana central, absorbiendo el exceso de líquido que pudiera existir.

Desarrollo del Método.

La muestra biológica deberá aplicarse sobre el papel de filtro situado bajo "la ventana de aplicación de la muestra" (Fig 2: A). La cantidad de muestra a aplicar no tiene que ser exacta, bastarán un par de gotas, las necesarias para empapar el papel de la ventana y mantener a este húmedo durante un máximo de dos a tres minutos. Si la muestra fuera insuficiente para ello, tras su aplicación se añadirían 30µl de solución PBS 0'15M a pH 7'4. En el caso de muestras de sangre, se añadirá en todos los casos ésta misma solución adicionada de peróxido de hidrógeno, (110 volúmenes) al 75%.

Fiabilidad y especificidad del sistema.

Con objeto de valorar la fiabilidad y especificidad del "Kit", hemos realizado un estudio con sueros humanos procedentes, de pacientes infectados con *E.granulosus* confirmados quirúrgicamente confirmados, de pacientes con otras parasitosis, y de donantes sanos.



Para ello se utilizó el test inmunoenzimático (ELISA, Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) descrito por Rogan M.T et al. 1991 (Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 85: 773-777), con el mismo antígeno.

ES 2 119 674 B1

Los resultados obtenidos son coincidentes con los obtenidos con el Kit objeto de patente (figura 1), salvo en uno de los sueros de leishmaniosis que por la técnica ELISA resultó negativo mientras que procesado por el "Kit" dió positivo.

5 Para el mismo propósito, se utilizó también el test de Aglutinación de Látex comercial (LBTEX HIDATIDOSIS, TEX) fabricado con tecnología y supervisión de la Cátedra de Inmuriología (CIFQ) de la Facultad de Química Universidad de la República Oriental del Uruguay. Es una prueba rápida para la detección de anticuerpos anti-*E.granulosus* en sueros.

10 Los resultados aparecen en la tabla 2, y la correlación con el "Kit" se refleja en la tabla 3, donde puede verse la detección de tres falsos positivos con el test de aglutinación, y dos con el "Kit".

TABLA 2

Aglutinación de látex

15

Parasitosis (Nú. casos)	Resultados (N° de sueros)			
Hidatidosis (20)	+++ (5)	++ (5)	+(8)	-(2)
Cisticercosis (4)	+++ (1)	++ (1)		-(2)
Toxoplasmosis (4)				-(4)
Leishmaniosis (4)			+(1)	-(3)
Donantes sanos (6)				-(6)

20

25

30

+++ Agregados grandes sobre fondo transparente.

++ Agregados medianos sobre fondo ligeramente turbio.

35

+ Agregados pequeños sobre fondo turbio.

- Ausencia de aglutinación (Aspecto uniforme).

TABLA 3

Correlación entre el test de aglutinación y el "Kit" objeto de la patente

40

Parasitosis	Nú. de sueros	Aglutinación-latex (Positivos)	Kit (Positivos)
Hidatidosis	20	18	19
Cisticercosis	4	2	1
Toxoplasmosis	4	0	0
Leishmaniosis	4	1	1
Donantes sanos	6	0	0

45

50

55

Explicación de las Figuras.

Fig. 1.- A) refleja un resultado positivo. B) Refleja un resultado negativo. C) Representa al soporte antes de la aplicación del fluido biológico a examinar.

60

Fig. 2.- Esquema longitudinal de la tira reactiva en su soporte. Este consta de dos láminas de plástico, que encajan albergando a la tira reactiva. La lámina superior tiene tres ventanas cuadradas de

ES 2 119 674 B1

igual tamaño (A, B y C). La lámina inferior tiene dos expansiones en ambos extremos (D y E), para facilitar su manipulación. La expansión D, sirve de tope, al introducirlo en el contenedor. E, está provista de un orificio central, para colgarla.

5 Fig.3.- Esquema transversal de la tira reactiva y su soporte. F.-plástico inferior, sobre el que se sitúa la tira reactiva. G.- celulosa en polvo comprimida. H.- plástico superior con tres ventanas (A, B y C), de igual tamaño.

10 Figura 4.- Esquema del contenedor albergando al equipo de diagnóstico. M.- Guías que permiten introducir con facilidad el equipo de diagnóstico en el contenedor. I.- Bandas de material absorbente, que van a eliminar el exceso de solución lavadora, si se ha partido de una muestra de sangre. J.- Línea que marca, en el contenedor, el nivel máximo de solución lavadora, en el caso de muestras de sangre.

15 Figura 5.- Esquema en sección del contenedor, mostrando las gulas para introducción del soporte de la tira reactiva (M), y una de las bandas de material absorbente (I), para eliminar el exceso de líquido.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo y método para realizar el diagnóstico inmunológico rápido de la Hidatidosis consistente en un kit compuesto por una tira reactiva de material absorbente, un soporte que le alberga y un contenedor para transportarla **caracterizado** porque es una prueba muy rápida, (de 5 a 10 munitos), se realiza en un solo paso, no requiere operaciones filtrantes, no requiere fases de lavado (excepto en el caso de sangre como muestra biológica), no se requiere volumen exacto de muestra a analizar y los resultados se analizan por simple lectura visual.
2. Dispositivo y método para realizar el diagnóstico inmunológico rápido de la Hidatidosis según reivindicación 1 **caracterizado** por poseer una zona de aplicación en la tira reactiva para depositar cualquier tipo de fluido biológico.
3. Dispositivo y método para realizar el diagnóstico inmunológico rápido de la Hidatidosis según reivindicación 1 y 2 **caracterizado** por poseer una zona de incubación en la tira reactiva con partículas metálicas acomplexadas con un reactivo capaz de ligar antígenos o anticuerpos, según se trate, donde tiene lugar la reacción con el fluido biológico.
4. Dispositivo y método para realizar el diagnóstico inmunológico rápido de la Hidatidosis según reivindicación 1 a 3 **caracterizado** por poseer una zona de lectura en la que se sitúa un sistema “trampa” en posición transversal, que impide que continúe el desplazamiento de las partículas metálicas si la reacción es positiva, debido a la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Se sitúa además una banda coloreada longitudinal, con partículas ligadas inespecíficamente que aparecerá en todos los casos, y que en conjunción con la “trampa” transversal específica, dará lugar a un signo “+”, o a otro tipo de marca preestablecida, sólo en las reacciones positivas.
5. Dispositivo y método para realizar el diagnóstico inmunológico rápido de la Hidatidosis por detección de anticuerpos específicos según reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado** porque el soporte que contiene a la tira reactiva consta de dos láminas de plástico que la albergan para llevar a cabo la reacción. la lamina superior tiene tres ventanas coincidentes con las zonas indicadas en las reivindicaciones 2 y 4 denominadas: de aplicación y de lectura de resultados además de una zona final para visualizar el fin de la reacción.
6. Dispositivo y método para realizar el diagnóstico inmunológico rápido de la Hidatidosis por detección de anticuerpos específicos según reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado** porque el soporte de la tira reactiva posee dos expansiones en ambos extremos para facilitar su manipulación.
7. Dispositivo y método para realizar el diagnóstico inmunológico rápido de la Hidatidosis por detección de anticuerpos específicos según reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado** por poseer un contenedor de plástico para transportar y usar la tira reactiva y su soporte, que consta de unas guías longitudinales para introducir el equipo, unas bandas de material absorbente y una línea que marca el nivel máximo de solución lavadora en el caso de muestras sanguíneas.
8. Dispositivo y método para realizar el diagnóstico inmunológico rápido de la Hidatidosis por detección de anticuerpos específicos según reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado** por el uso del antígeno empleado o cualquier otro de alta sensibilidad y especificidad.

50

55

60

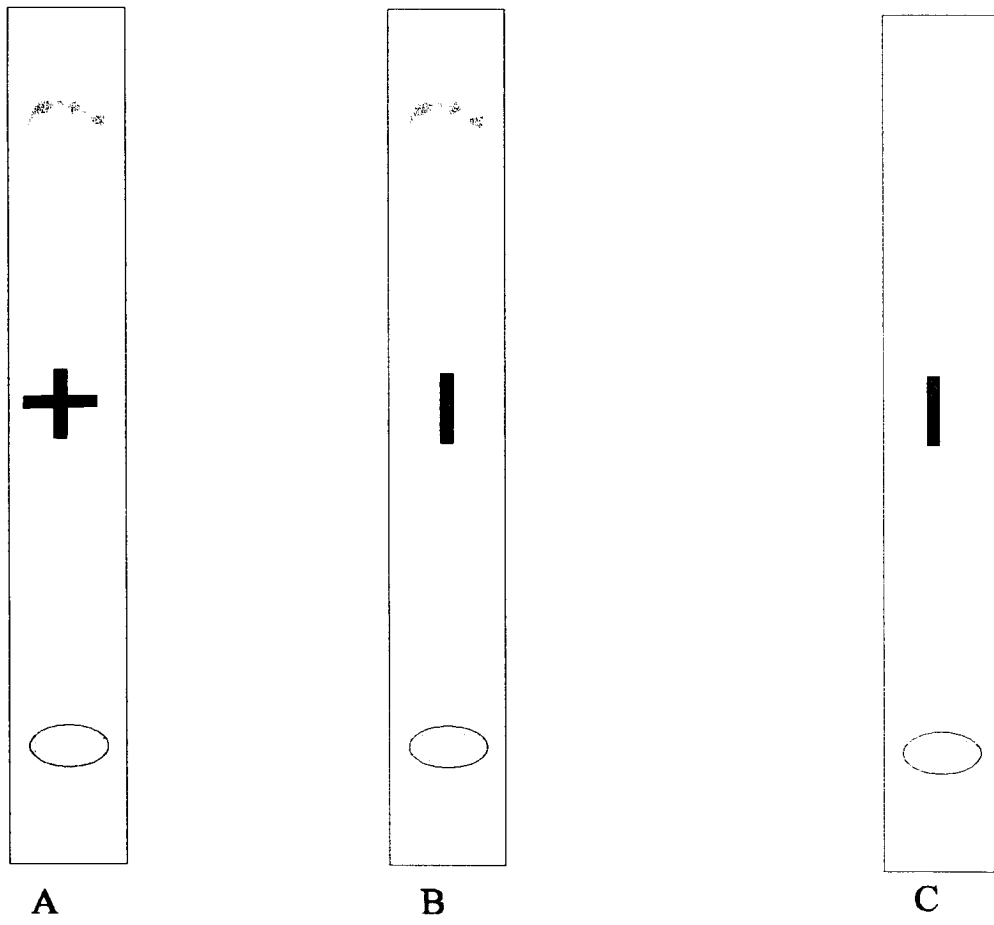


Fig. 1

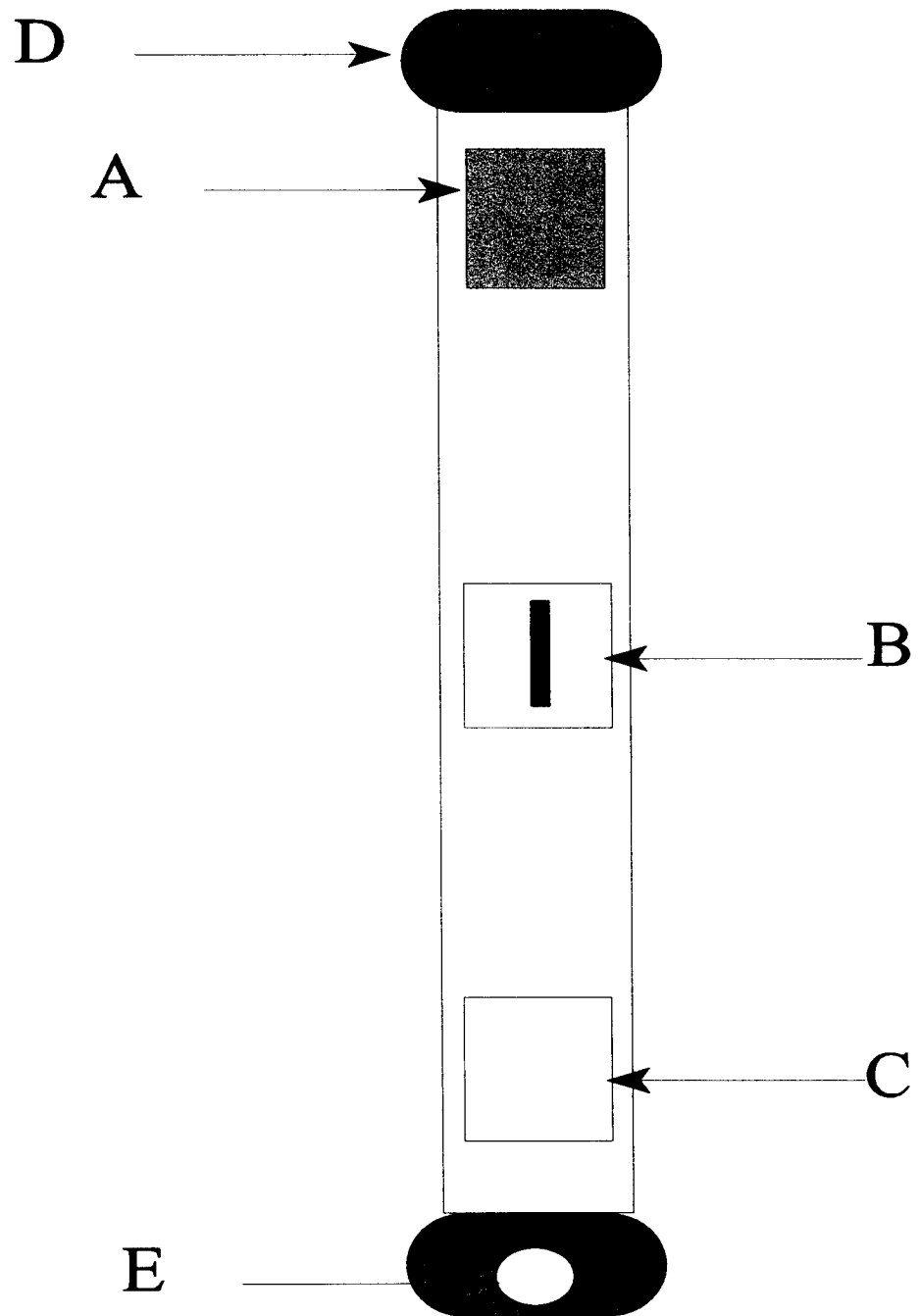


Fig.2

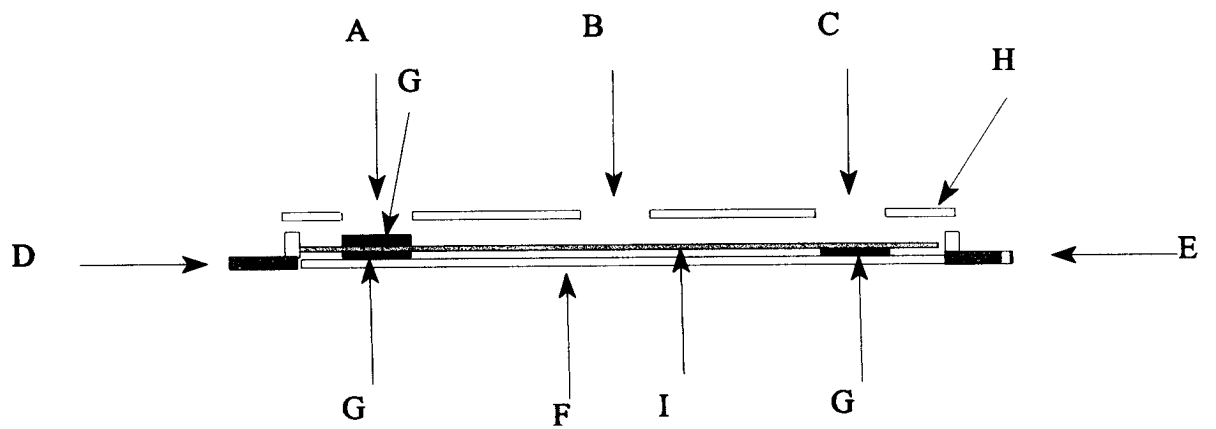


Fig. 3

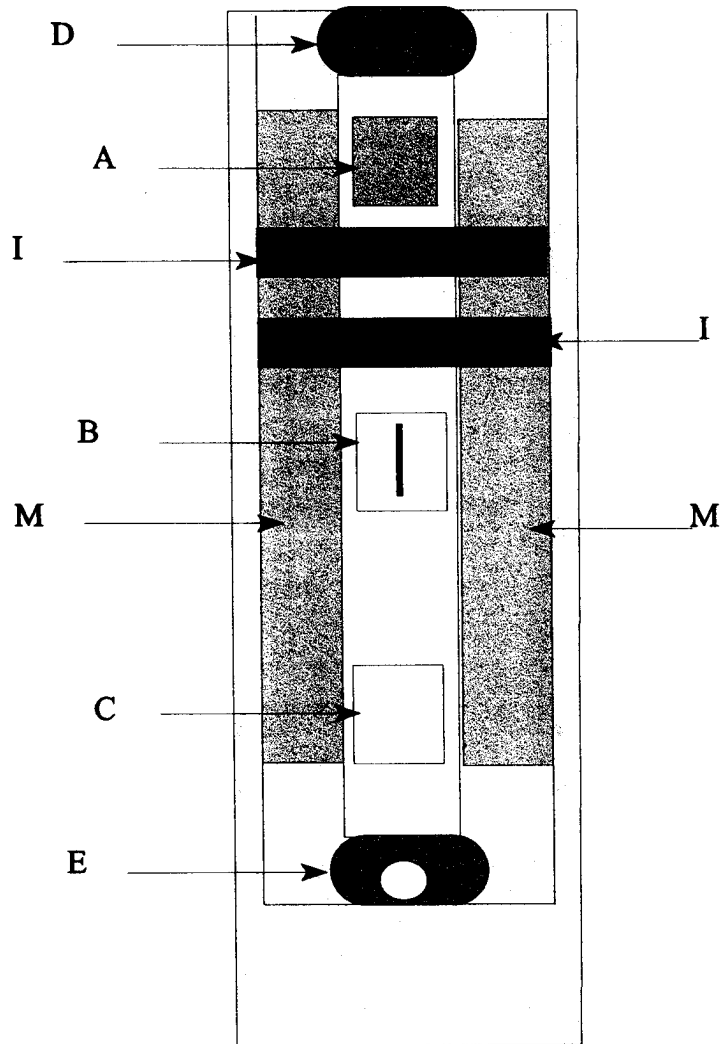


Fig. 4

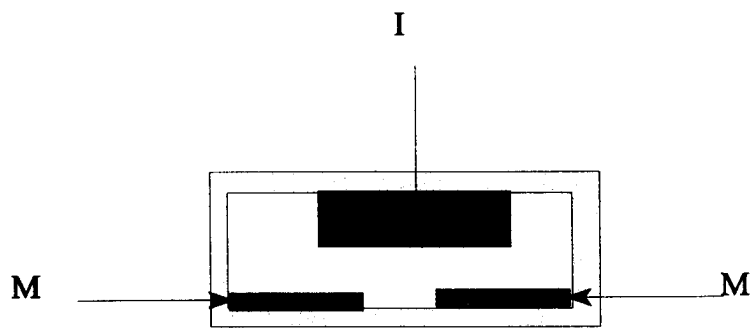


Fig. 5



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: G01N 33/543

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US-4717656-A (CARL G.P. SWANL JUNG) 05.06.1988	
A	US-4962043-A (MORIHARU NEGASE et al.) 09.10.1990	
A	WO-9015327-A (GOULD MARTIN et al.) 13.12.1990	
A	EP-0402023-A (E-Y LABORATORIES INC.) 12.12.1990	
A	WO-9415215-A (OY MEDIX BIOCHEMICA AB) 17.07.1994	
A	WO-9517965-A (ABBOTT LABORATORIES) 06.07.1995	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
31.08.98

Examinador
M. Ybarra Fernández

Página
1/1