

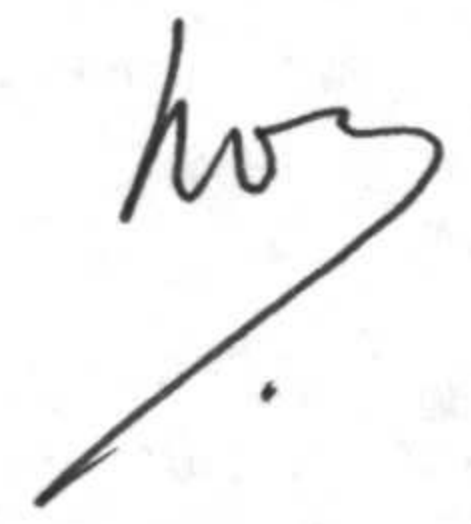
T-16/52 T
15
121

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha **23 ENE. 1996**
ENTRADA NUM. **124**

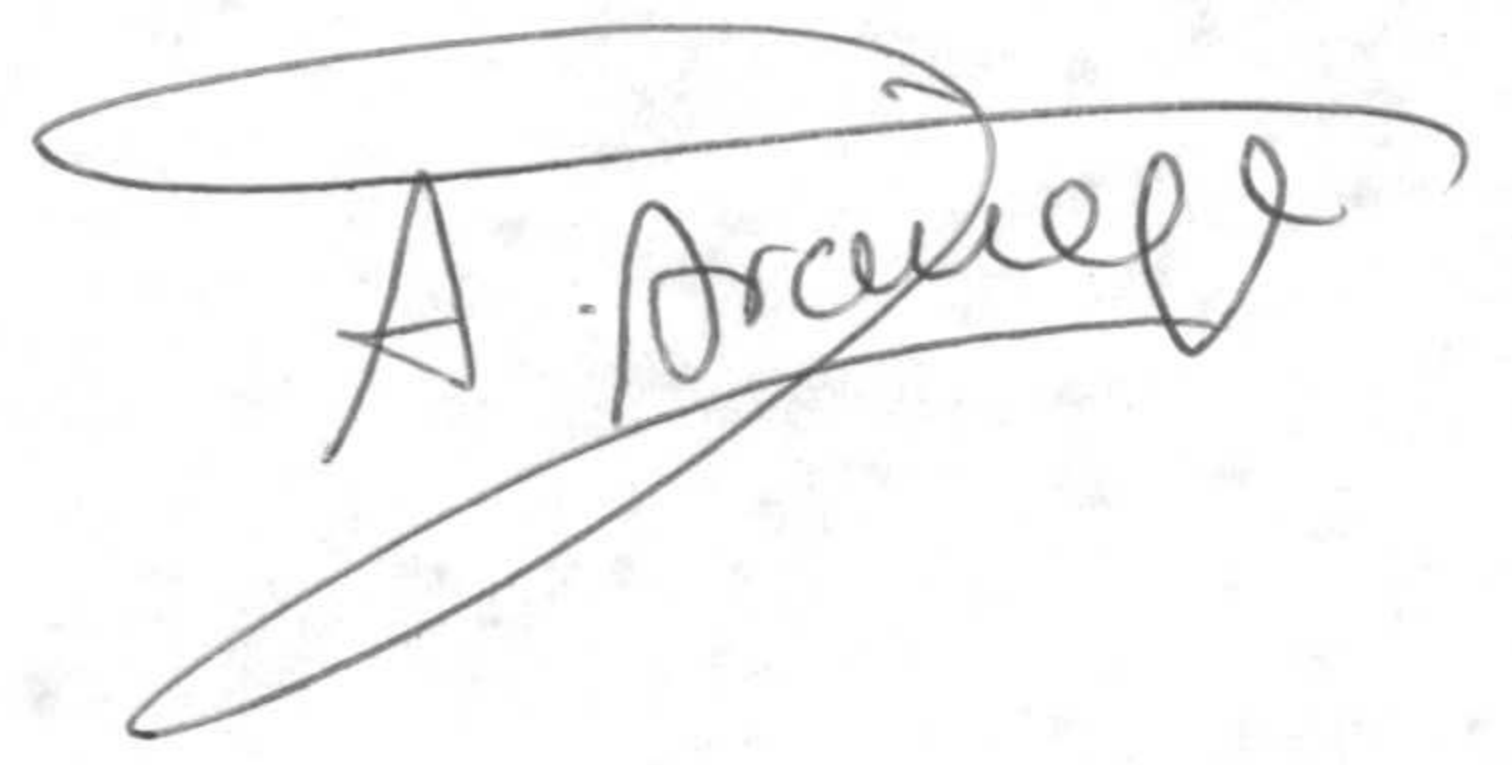
**CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO DE LA RESPUESTA
INMUNE HUMORAL FRENTE A *E. GRANULOSUS***

EL DIRECTOR



Prof. Dr. D. Antonio Osuna

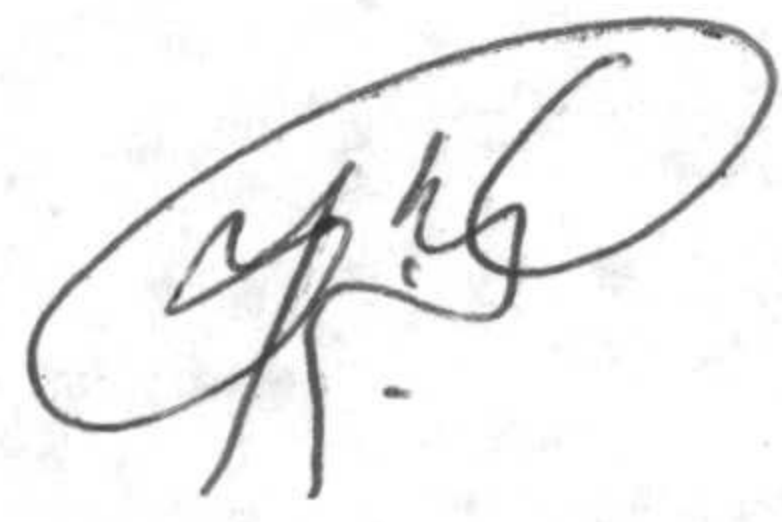
LA TUTORA



Prof. Dra. Dña. Antonia Aranega

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento **SA682281**
Nº Copia **21232039**

**Tesis presentada para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas, por el
Ido. YOUNES SBIHI.**



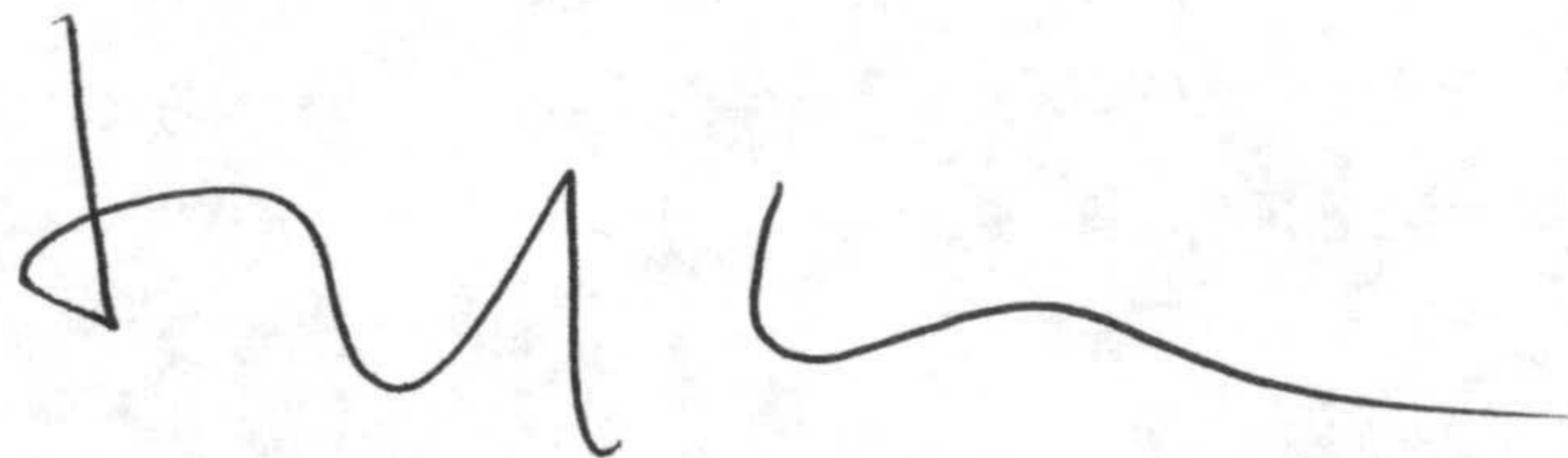
Granada, Enero de 1996

UNIVERSIDAD DE GRANADA
17 ENE. 1996
COMISION DE DOCTORADO

Los trabajos de investigación expuestos en la presente memoria titulada "CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL FRANTE A E. GRANULOSUS", han sido realizados en los Laboratorios del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada, bajo la supervisión del Doctor D. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz.

Granada, Enero de 1996.

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO



Fdo.: Dr. Dn. Fermín Sánchez de Medina Contreras

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Introducción general.	1
1.2. El parásito: <i>Echinococcus granulosus</i>	2
1.2.1. Morfología y ciclo de vida.	3
1.2.2. Distribución geográfica y epidemiología.	6
1.2.3. Patología y Sintomatología.	9
1.2.4. Diagnóstico.	10
1.2.5. Tratamiento y Profilaxis.	13
2. ANTECEDENTES.	15
2.1. Generalidades.	15
2.2. Inmunología de la Hidatidosis.	16
2.2.1. Respuesta celular.	16
2.2.2. Respuesta humoral inespecífica.	18
2.2.3. Respuesta humoral específica.	18
2.2.4. Inmunocomplejos circulantes y reacciones de autoinmunidad. ...	19
2.3. Constitución antigénica de <i>E. granulosus</i>	20
2.3.1. Caracterización de los antígenos.	21
2.3.2. Los antígenos mayoritarios.	22
2.2.3. Especificidad de los antígenos.	24
2.3.4. Otros antígenos.	27
2.4. EL Diagnóstico de la Hidatidosis.	28
2.4.1. Diagnóstico Molecular.	28
2.4.2. El diagnóstico inmunológico de la hidatidosis.	29
2.4.2.1. Detección de anticuerpos para el diagnóstico clínico. ...	30
2.4.2.2. Seroepidemiología.	32
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	34

3.1. Material biológico utilizado.	34
3.1.1. Material parasitario.	34
3.1.2. Sueros.	34
3.2. Precipitación de proteínas.	35
3.3. Eliminación de las sales por dialisis.	35
3.4. Determinación de la concentración de proteínas.	35
3.4.1. Método de Micro-Lowry.	36
3.4.1.1. Reactivos.	36
3.4.1.2. Procedimiento.	36
3.5. Técnicas cromatográficas.	37
3.5.1. Cromatografía líquida convencional.	38
3.5.1.1. Cromatografía de afinidad.	38
3.5.1.2. Cromatografía en gel de Concanavalina A-Sepharosa.	44
3.5.1.3. Cromatografía de exclusión molecular.	45
3.6. Precipitación del inmunocomplejo en los sueros de pacientes.	46
3.6.1. Procedimiento.	46
3.7. Método de purificación del complejo antigénico b y 5.	47
3.7.1. Procedimiento.	47
3.8. Electroforesis.	48
3.8.1. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en presencia de Lauril Sulfato Sódico (SDS-PAGE).	49
3.8.1.1. Aparato de electroforesis.	50
3.8.1.2. Composición de los geles.	50
3.8.1.3. Preparación y aplicación de las muestras.	52
3.8.1.4. Tinción con nitrato de plata.	53
3.8.1.5. Calculo del peso molecular por electroforesis en presencia de SDS (SDS-PAGE).	54
3.8.2. Isoelectroenfoque (IEF).	54
3.8.2.1. Composición y preparación del gel.	56
3.8.2.2. Procedimiento y aplicación de la muestra.	56
3.8.2.3. Tinción con nitrato de plata.	57
3.8.3. Electroforesis bidimensional (2D-PAGE).	58

3.8.3.1. La primera dimensión (IEF).	58
3.8.3.2. Segunda dimensión (SDS-PAGE).	60
3.8.3.3. Tinción con nitrato de plata.	61
3.9. Técnicas inmunológicas.	62
3.9.1. Ensayo inmunoenzimático (ELISA).	62
3.9.1.1. Reactivos.	63
3.9.1.2. Procedimiento.	63
3.9.2. Inmunotransferencia (Immunoblotting).	64
3.9.2.1. Reactivos.	65
3.9.2.2. Procedimiento.	66
3.9.2.3. Determinación de los pesos moleculares.	67
3.9.3. Dot-ELISA.	67
3.9.3.1. Reactivos.	68
3.9.3.2. Procedimiento.	68
3.9.4. Criterio de positividad y análisis estadístico.	69
3.9.5. Ensayo inmuno-oro (gold immunoassay).	70
3.9.5.1. Oro coloidal.	70
3.9.5.2. Preparación del complejo proteína A-oro coloidal.	72
3.9.5.3. Reactivos.	73
3.9.5.4. Procedimiento.	74
3.9.6. Aglutinación de látex.	75
3.9.6.1. Fundamento.	75
3.9.6.2. Reactivos y controles.	75
3.9.6.3. Procedimiento.	76
3.9.6.4. Interpretación de resultados.	76
4. RESULTADOS.	78
4.1. Estudio mediante cromatografía de afinidad y SDS-PAGE de los diferentes antígenos del metacestode <i>E. granulosus</i> reconocidos por las inmunoglobulinas A, E y M del huesped.	78
4.2. Estudio de dos fracciones del suero.	83

4.3. Caracterización de los inmunocomplejos circulantes.	84
4.3.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y semidesnaturalizantes de los inmunocomplejos circulantes.	84
4.3.2. Inmunotransferencia del CIC frente a las diferentes clases de inmunoglobulinas.	85
4.3.3. Inmunodetección de componentes parasitarios anti-IgG del CIC.	86
4.3.4. Inmunodetección de los componentes anti-Ig totales formando parte del inmunocomplejo circulante.	87
4.3.5. Isoelectroforesis del inmunocomplejo circulante.	88
4.3.6. Detección de componentes anti-IgG en el CIC por inmunotransferencia tras una electroforesis bidimensional.	89
4.4. Resultados de las técnicas inmunológicas.	90
4.4.1. Detección de anticuerpos anti- <i>E. granulosus</i> por ELISA.	90
4.4.2. Inmunotransferencia de los componentes de cuatro preparaciones antigénicas.	95
4.4.3. Reactividad diferencial específica de las inmunoglobulinas G, A y E por inmunotransferencia.	102
4.4.4. Caracterización del componente de la fracción Ag 5/B anti- IgA de pacientes.	105
4.4.5. Resultados de Dot-ELISA.	106
4.5. Desarrollo de un "Kit" de diagnóstico para la hidatidosis.	107
4.5.1. Fiabilidad y especificidad del "Kit".	108
5. DISCUSIÓN.	111
6. BIBLIOGRAFÍA.	117

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción general.

Hipocrates habla de lo que posteriormente se ha denominado como hidatidosis, en " los casos en que el hígado esta lleno de agua y revienta dentro del epiplon, el vientre se llena de agua y el paciente muere" (Jones, 1948).

Actualmente la hidatidosis o Echinococcosis se considera una zoonosis ampliamente distribuida por todo el planeta. Su agente etiológico es el verme *Echinococcus granulosus* (Rudolphi, 1801), un pequeño cestode perteneciente al orden Cyclophillidea. Se trata de una cestodosis larvaria que afecta a diferentes herbívoros y omnívoros, entre los cuales se encuentra el hombre. La especie humana puede actuar como hospedador intermediario y como resultado de la infestación aparecen estructuras quísticas que se pueden desarrollar en cualquier órgano o tejido, con mayor frecuencia en el hígado. Lejos de ser un problema resuelto, la hidatidosis constituye hoy un problema de salud pública con importantes repercusiones económicas (Matossian y col., 1977).

En los países desarrollados, las intervenciones quirúrgicas debidas a la hidatidosis son elevadas. El coste de ellas en España, se cifra en unos 70 millones de pesetas por cada 50 intervenciones, sin tener en cuenta las pérdidas laborales y la morbilidad (J. Lazuen, Tesis Doctoral 1992, Univ. Granada).

Los mayores niveles de parasitación, tanto humana 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, Tunez, Libia, y Argelia, los niveles de parasitación alcanzan valores elevadísimos. Thompson y Smyth (1975) evaluaron las pérdidas sólo por decomisos en la ganadería del Reino Unido, donde la enfermedad no alcanza los niveles de otros países, en unas 700.000 libras esterlinas al año. En Australia, Kumaratilake y

Thompson (1982) estimaron las pérdidas anuales en 12 millones de dólares. En Chile las pérdidas alcanzan en la economía local unos 5 millones de dólares.

Aparte de estos datos y de la importancia sanitaria, hay muchos aspectos del parasitismo por la larva de este cestode que se desconocen. Algunos, aspectos tan básicos como el diagnóstico inmunológico específico y diferencial, el tratamiento y la inmunoprofilaxis se encuentran aun en una fase precaria de conocimiento.

Respecto al inmunodiagnóstico, Cameron (1960), Huldt y col. (1973), Gottstein y col. (1983, 1986, 1987) y Leightowers y col. (1984), demostraron que la respuesta serológica de los hospedadores intermediarios está influenciada no sólo por la especie sino también por la cepa de *Echinococcus*. Consecuentemente la heterogeneidad antigénica debe ser tenida en consideración en el desarrollo y la elección del procedimiento inmunodiagnóstico en las diferentes áreas endémicas. Recientemente han sido realizados muchos trabajos enfocados a encontrar y caracterizar una fracción antigénica para el inmunodiagnóstico, que no esté afectada por las diferencias de cepas.

La importancia de estos fenómenos inmunológicos, nos ha motivado al desarrollo del presente trabajo de investigación, donde tratamos de estudiar la respuesta seroinmunológica, así como la caracterización de los antígenos de interés.

1.2. El parásito: *Echinococcus granulosus*.

Echinococcus granulosus Rudolphi, 1801 es un cyclophilideo, que como tal exhibe las características de este grupo. El cuerpo está por formado por un escólex a partir del cual se originan una serie de tres o cuatro estructuras reproductivas llamadas proglótides.

La clasificación más universalmente aceptada para este parásito es la siguiente

(Wardle y col. 1974);

Phyllum: Plathyhelminthes

Clase : Cestoda

Subclase: Eucestoda

Orden : Cyclophyllidea

Familia: Taenidae

Genero: Echinococcus

Dentro del Género *Echinococcus*, se han descrito 16 especies y al menos 13 subespecies, pero solamente cuatro especies de este género han sido validadas taxonómicamente, *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthus* y *E. vogeli* (Thompson, 1982). Smyth en 1964, propone como explicación al proceso de especiación, tanto la capacidad autofecundadora del adulto (dado que es hermafrodita), como los procesos de reproducción asexual que se dan en la fase de metacestode o hidátide del parásito.

1.2.1. Morfología y ciclo de vida.

En estado adulto *E. granulosus* vive adherido estrechamente a las vellosidades intestinales del duodeno de los hospedadores definitivos, principalmente cánidos. Es un cestode de 3-5 mm de longitud, provisto de un escólex piriforme de 300 μ de diámetro, con 4 ventosas y un rostelo formado por una doble corona de ganchos, cuyo número y longitud puede variar de unas cepas a otras. Le sigue una zona de cuello corto y a continuación, un estróbilo que está constituido por 3 anillos o proglótides: un anillo inmaduro, un anillo maduro y un anillo grávido, el cual es el más largo y ancho de los tres. El anillo maduro incluye un número de testículos comprendido entre 45-65, distribuidos anterior y posteriormente, un ovario bilobulado en posición posterior, y un poro genital más o menos central. Le sigue un anillo grávido que representa la mitad aproximadamente de la longitud total del

cuerpo. En él se observa un útero con sus evaginaciones laterales; éste puede disgregarse liberando un número relativamente bajo de huevos (entre 400-800).

El huevo de *E. granulosus* es semejante al de *Taenia*. Es esférico o ligeramente elipsoide, con un tamaño que oscila entre 30 y 40 μm de diámetro. Al microscopio óptico, es indistinguible del de *Taenia*, y a nivel ultraestructural del de la especie *E. multilocularis*. Son huevos que constan de un embrión hexacanto u oncosfera que va rodeado de varias envolturas (Swidorski, 1982), siendo la más destacada el embrióforo por el aspecto estriado y oscuro que le confiere al huevo. Son muy resistentes a los agentes físicos, pudiendo permanecer infectivos durante largos períodos de tiempo, en condiciones de humedad y temperatura adecuadas (Wachira y col. 1991).

Cuando los hospedadores intermediarios susceptibles de ser parasitados, principalmente ovejas y cabras, aunque se han descrito hasta un total de 50 especies entre ellas el hombre, ingieren huevos, éstos, por acción de enzimas proteolíticas (digestivos), producen la disgregación del embrióforo (Lethbridge, 1980) conduciendo a la eclosión de las larvas hexacantas que se activan en presencia de la bilis fijándose a las microvellosidades del duodeno. Atravesando la mucosa intestinal, por acción de los enzimas histolíticas secretadas por el parásito, alcanzan la circulación portal a través de la cual son transportadas hasta la primera red capilar en importancia que es el hígado. En ocasiones, se puede producir el paso de embriones a la cavidad cardíaca derecha y por vía suprahepática cava inferior, alcanzan la segunda red capilar en importancia que es el pulmón. Otros embriones pueden pasar al corazón izquierdo y a través de la aorta pueden pasar a bazo, riñón etc...

En cualquier localización el embrión al cabo de unos 4 días se transforma en un pequeño quiste hidatídico. Este es típicamente unilocular (solo forma una cavidad), que al cabo de un mes aproximadamente posee un diámetro de 1mm, soliendo crecer a razón de 1 mm/mes y pudiendo alcanzar grandes tamaños. Su membrana se diferencia en: una membrana adventicia de estructura fibrosa,

producida por el hospedador como reacción frente al parásito, una membrana laminar opaca anucleada, formada por una serie de capas concéntricas de estructura semejante a la quitina, y una membrana germinativa nucleada de la que emergen masas de células hacia el interior de la cavidad quística, masas que primeramente son vacuoladas y posteriormente pedunculadas y que van a dar origen a cámaras secundarias o capsulas prolíferas, a partir de cuya capa interna se forman los protoescólices que se encuentran invaginados. A los quistes que no forman estas cápsulas se les denomina estériles o acefalocísticos.

Healt y Osborn en 1976 mediante observación al microscopio electrónico, proponen que la membrana laminar es originada por la membrana germinativa.

Rellenando el espacio interno de la cavidad quística existe un líquido transparente, cristalino, compuesto por agua, NaCl, hidratos de carbono, proteínas y lípidos entre otras sustancias, y que posee propiedades antigénicas. Es el denominado líquido hidatídico (LH).

En contacto con el tejido u órgano en el que se encuentra implantado el quiste se produce una reacción por parte de dichos tejidos, lo que da lugar a la formación de la membrana adventicia, constituida por células epiteloides, linfocitos, monocitos, neutrófilos polimorfonucleares y tejido parenquimatoso.

Cuando los hospedadores definitivos, principalmente cánidos (perros en nuestro entorno), ingieren vísceras procedentes de hospedadores intermediarios conteniendo quistes fértiles, los protoescólices, después de la acción de la pepsina en el estómago, en presencia de la bilis y con el cambio de pH, se evaginan y se fijan a las vellosidades intestinales. A las 4-6 semanas aproximadamente se transforman en un cestode adulto, sexualmente maduro cerrándose con la expulsión de los huevos en las heces, el ciclo de vida del parásito.

En nuestras latitudes, se ha descrito un ciclo rural perro-oveja, hablándose también de un ciclo urbano o periurbano en el que se engloba el hombre, y un ciclo salvaje con herbívoros y cánidos, que se da mayoritariamente en regiones meridionales. Los ciclos no son cerrados, sino que pueden existir interacciones entre

ellos (Schantz, 1.983).

La transmisión del parásito al hombre se puede producir por vía directa con los animales que actúan como hospedadores definitivos (perro, lobo, zorro, etc...), o bien de un modo indirecto, a través de aguas o alimentos contaminados con huevos del cestode. Los hospedadores intermediarios habituales se infectan por ingestión de huevos dispersos en el suelo o en el agua. (figura 1.1: ciclo de vida).

1.2.2. Distribución geográfica y epidemiología.

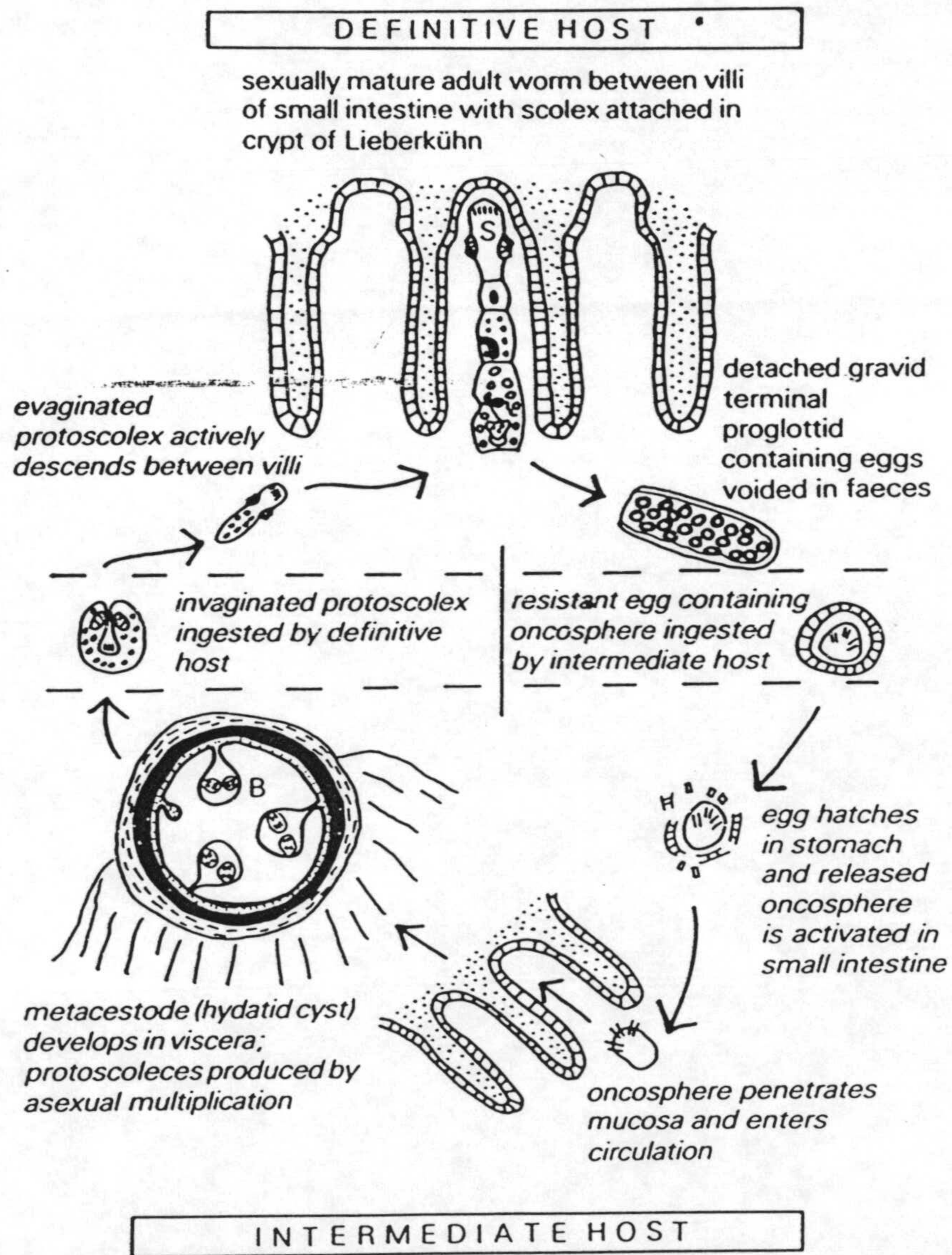
Se han descrito cuatro especies del género *Echinococcus*: *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. vogeli*, y *E. oligarthus*, siendo las tres primeras las capaces de parasitar al hombre, pues Lopera y col. (1989) describieron un caso humano de quiste hidatídico ocular en Venezuela por *E. oligarthus*.

Euzeby J, (1990) estipula que la especie *E. granulosus*, incluye geográficamente 2 grupos: Uno formado por las dos sub-especies; *E.g.boreli* y *E.g.canadensis*, y el grupo europeo, que actualmente es cosmopolita formado también por 2 sub-especies; *E.g.equinus* incapaz de infectar el hombre y *E.g.granulosus*, con varias cepas y clones dependiendo de los hospedadores intermediarios.

La especie *Echinococcus granulosus* es cosmopolita, si bien se pueden definir focos endémicos donde la parasitación es más intensa, como el caso de Australia, Nueva Zelanda y los países de la cuenca mediterránea. Actualmente se considera la región de Río Negro (Argentina) como que presenta mayor número de casos diagnosticados al año.

En España, entre 1986 y 1990 se diagnosticaron un total de 3618 nuevos casos de hidatidosis (Gallardo y Bereciartua, 1991; Mate, 1991). Durante este tiempo

Figura 1.1: El ciclo de vida de *E. granulosus*.



la incidencia anual fue de 1,9 nuevos casos en 100.000 habitantes. Generalmente las zonas más afectadas coinciden con las zonas dedicadas a la ganadería, como son Navarra, la Rioja, Aragón, Castilla-león, Castilla la Mancha y Extremadura.

En su ciclo de vida se pueden ver envueltos animales domésticos tales como oveja, gato, perro, cerdo, camello, vaca, caballo, búfalo, etc..., es decir hospedadores definitivos considerados animales de compañía y hospedadores intermediarios de gran importancia industrial y en la alimentación humana. El ciclo epidemiológico que podemos observar con mayor frecuencia es el ciclo rural (perro-oveja). También se ha descrito un ciclo urbano y periurbano (en el que interviene el hombre) y un ciclo salvaje (herbívoros y omnívoros - cánidos salvajes), manifestándose con mayor frecuencia en regiones templadas y cálidas. En las regiones árticas se ha descrito también un ciclo rural y un ciclo salvaje, siendo distintos los hospedadores intermediarios. Sin embargo, en Inglaterra coexisten el ciclo perro-oveja y el ciclo perro-caballo, siendo cepas diferentes del parásito las causantes de la infestación (Smyth, J.D., 1979).

La ausencia o existencia de estos ciclos epidemiológicos, y la dinámica de transmisión se deben a una serie de factores, que se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Factores que influyen en el ciclo de vida de *E. granulosus*.

<u>Factores extrínsecos</u>	<u>Factores socio-ecológicos</u>	<u>Factores intrínsecos</u> (Verme)
- Temperatura adecuada	- Agricultura	- Entorno potencial
- Humedad adecuada	- Comportamientos de	favorable para su
- Agentes que dispersen	hospedadores definitivos e	desarrollo
los huevos de las heces	intermediarios	- Resistencia innata a
	- Legislación e inspección	la infección
	alimentaria	- Resistencia adquirida
	- Nivel de higiene de la	a la infección
	población	

1.2.3. Patología y Sintomatología.

La hidatidosis, en más de un 60% de los casos es asintomática (Caremani y col. 1991), por lo que en muchas ocasiones se detecta accidentalmente en el transcurso de un examen radiológico, o por otras circunstancias.

La hidatidosis en el hombre y demás hospedadores intermediarios, es una enfermedad parasitaria con diversas manifestaciones en cuanto a la patología y sintomatología, que dependen de la localización anatómica y del tamaño que alcanzan los quistes en su desarrollo. Schantz en 1.972, determina tras el estudio de 30.000 pacientes afectados, como en el 60 % de los casos la localización del quiste es hepática, en un 10-20 % pulmonar, y el 20 % restante presenta una localización repartida por el resto del organismo. Dévé en 1949, observó como las oncosferas a través de las microvellosidades intestinales penetran en la circulación portal llegando al hígado, pero también vio como 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.

El comienzo de los 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 se localiza en la región abdominal. En ésta la sintomatología comienza a aparecer cuando el quiste adquiera un tamaño tal que llega a presionar a los órganos adyacentes.

Cuando el quiste alcanza un gran tamaño, se puede originar una fisuración del mismo, vertiendose pequeñas cantidades de líquido hidatídico a la circulación lo que hace que el hospedador desarrolle una respuesta anafiláctica acompañada de urticaria, prurito, y pudiendo aparecer ocasionalmente abscesos bronquiales, biliares o procesos de embolismo arterial como consecuencia de la diseminación de restos quísticos a localizaciones periféricas.

Cuando la localización del quiste es hepática, afecta fundamentalmente al

lóbulo derecho, y cursa con síntomas inespecíficos tales como dolor abdominal y procesos febriles. En ocasiones cuando el quiste se encuentra en la zona convexa del hígado, se puede producir una dilatación torácica y una elevación diafragmática, e incluso se puede producir una ruptura en los bronquios con las consiguientes molestias respiratorias.

La segunda localización en frecuencia es la pulmonar afectando al lóbulo inferior del pulmón derecho. La evolución consiste en una fisuración y ruptura en los bronquios produciéndose hemoptisis, tos, expectoración crónica (Jerray y col. 1992) y pudiéndose expulsar, en determinadas ocasiones el contenido del quiste mediante expectoración, denominándose "tos vómica". En este caso, si no se llega a producir la muerte por asfixia, el paciente puede recuperarse totalmente.

En ocasiones (0,2 al 2,4 % de los casos), se puede encontrar una localización encefálica del quiste. Schantz en 1972, describió un caso de hidatidosis cerebral en un joven, con una elevación de la presión intracraneana acompañada de convulsiones, vómitos, pérdida de la orientación espacial y temporal, y en ocasiones pérdida de la sensibilidad a nivel cortical con pérdida de visión, y manifestaciones que hacen recordar episodios de epilepsia.

Duran en 1978 describió 19 casos de hidatidosis ósea, afectando a la espina dorsal, pelvis, fémur, y siendo la localización más frecuente en huesos largos. Los daños causados, en ocasiones eran irreparables, dado que el diagnóstico era debido a una fractura patológica. En otras ocasiones, se han producido deformaciones óseas con el consiguiente perjuicio funcional del sistema óseo.

Si el quiste llegara a calcificarse, se puede producir una involución del mismo y una curación espontánea del paciente (Bernardini y valle, 1991).

Según todo lo descrito anteriormente resulta evidente que la equinococosis unilocular puede afectar a cualquier órgano o tejido, y puede llegar a confundirse con multitud de enfermedades (Bähr, 1981).

1.2.4. Diagnóstico.

El diagnóstico clínico de la hidatidosis se basa en:

- La sintomatología y la historia epidemiológica del enfermo.
- Los exámenes radiológicos: Ultrasonografía (US), Ecografía, Tomografía Computerizada (CT), Rayos-X, Imágenes de Resonancia Magnética (MRI)...etc.

El valor diagnóstico de estas pruebas físicas ha sido minuciosamente estudiado por varios autores (Haertel y col. 1980; Reeder y Palmer, 1981; Beggs, 1985; Lewall y col. 1985; Von Sinner, 1990, 1991; Morris and Richards, 1992).

Muchas de estas pruebas radiológicas, aportan datos precisos sobre la localización anatómica del quiste, pero obviamente en algunos casos no discriminan entre hidatidosis y otras patologías quísticas o tumorales (Hugier M y col. 1987). La estructura y composición del quiste hidatídico presenta una imagen radiológica con densidad de agua, lo cual puede dar lugar a diagnósticos erróneos salvo que la localización del quiste permita una clara identificación, o que se utilicen sistemas de contraste con el subsiguiente riesgo que implican para el paciente.

- El diagnóstico inmunológico.

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 (Liu D y col. 1993), y mediante la detección de inmunocomplejos circulantes (D'Amelio R y col. 1989, Craig PS 1986, Rosario Bonifacino y col. 1993).

Detección de anticuerpos de clase IgE: La elevación de las tasas séricas de IgE es característica de parasitosis provocadas por *Ascaris lumbricoides*, *Toxocara canis*, *Capillaria phillippensis*, *Schistosoma spp*, y *Echinococcus 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 varios 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 (Conder y col., 1980); Cuantificación de la tasa de IgE total (Larrand y col., 1984); Detección de IgE sérica específica (Abril M.J., 1988) y Degranulación de basófilos humanos (Leynadier y col., 1980).

Detección de anticuerpos de clases IgG o IgM:

Las pruebas basadas en su detección son: Fijación de complemento (Kagan y col. 1966); Inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Matossian y col. 1979); Inmunoelectroforesis (Calderón y col. 1977, Valera-Díaz y col. 1975); Doble difusión; Aglutinación de partículas de látex (Tassi y col. 1981, Barbieri y col. 1993); Hemaglutinación indirecta (Matossian y col. 1979); Radioinmunoanálisis (RIA) (Falagiani y col. 1979) e Enzimoimmunoanálisis (ELISA) (Barbieri y col. 1993, Rogan y col. 1991).

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% (Rogan y col. 1991), 83% (Barbieri y col. 1993), 80% (Matossian y col. 1979). Generalmente, tanto la especificidad como la sensibilidad dependen de la naturaleza del antígeno utilizado para sensibilizar la placa (fase sólida).

Si en lugar de utilizar plástico como fase sólida se emplean membranas de nitrocelulosa (Dot-ELISA), los resultados son semejantes a los obtenidos en microplaca, pero con ahorro de tiempo y reactivos (Rogan MT y col. 1991). Los sistemas amplificadores tipo biotina-avidina mejoran ligeramente la sensibilidad pero aumentan la tasa de falsos positivos (Zhanqing SH. 1988).

La Inmunotransferencia (Western Blot) combina el poder de resolución de la electroforesis en gel 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 (Kanwar J.R. y col., 1992; Verastegui M. y col., 1992; Leggatt G.R. y col. 1992, 1994; Siracusano A. y col., 1991).

Actualmente el diagnóstico serológico se considera una prueba confirmatoria de la etiología del proceso, imprescindible para un diagnóstico definitivo previo a una intervención quirúrgica.

1.2.5. Tratamiento y Profilaxis.

El tratamiento quirúrgico es el único que permite eliminar el quiste hidatídico. El mayor éxito de este tratamiento se consigue con quistes uniloculares de localización accesible (Mentha y col. 1991). En general, todas las técnicas quirúrgicas incluyen un tratamiento interno del quiste previo a su extirpación, de forma que se destruyan o esterilicen las estructuras internas (formol 2-10%, solución hipertónica de ClNa 33%, agua oxigenada-nitrato de plata, Cetrimide 0.1% en solución salina). Morris y Richards, 1992, realizaron varios estudios, tras los cuales no recomiendan en algunos casos el tratamiento preoperatorio, porque provocan síntomas de colangitis esclerosante, entre otros.

En los casos en los que resulta impracticable el tratamiento quirúrgico, bien por inaccesibilidad del quiste, o por la existencia de riesgo de rotura, que podría conducir a una equinococosis secundaria o una fuerte reacción anafiláctica, se aplicaría uno de estos tratamientos alternativos:

- Tratamiento biológico: con una inmunoterapia inespecífica mediante el empleo de sueros inespecíficos, o mediante estimulación de la inmunidad celular con BCG (Bacilo de Calmet y Guerin).

- Quimioterapia: Hace algunos años, se podía encontrar en numerosas publicaciones, como el mebendazol se consideraba como uno de los fármacos más eficaces contra el metacestode de *Echinococcus* en animales. Pero en humanos infectados con *E. granulosus* resultó poco eficaz (Danis y col. 1977). Posteriormente,

fué utilizado el flubendazol, pero tanto uno como otro debido a las elevadas dosis a las que demostraban eficacia y a los efectos colaterales, tales como reacciones alérgicas, alopecia y neutropenia (reversible), fueron poco a poco abandonados como fármacos de elección (Schantz, 1.982). De acuerdo con lo publicado por Saimont en 1.983 y por Morris en el mismo año, el albendazol presenta mejores niveles de absorción y más estabilidad en plasma que el mebendazol (Eckert, 1986, Loscher y col. 1992), siendo necesarias menores dosis que de los dos fármacos antes señalados. Estos dos fármacos han sido evaluados en estos últimos años por varios autores, especialmente por Eckert y Loscher, y recientemente son los más recomendados por la OMS (WHO, 1992).

Respecto a la profilaxis, dado que las infestaciones humanas son el resultado del contacto con perros parasitados con el cestode adulto, debe impedirse la parasitación de los hospedadores definitivos. Para ello habría que evitar que los perros se alimentaran con desperdicios crudos de ganado ovino, bovino y suíno, en áreas endémicas. Las medidas profilácticas recomendadas serían:

- Quimioterapia de los animales (perros) con praziquantel y bromohidrato de arecolina.
- Destrucción de los desperdicios de los mataderos mediante incineración o tratamiento con cal viva.
- Adecuadas campañas sanitarias de educación y divulgación del problema.

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES.

2.1. Generalidades.

La penetración y el establecimiento de un parásito son dependientes de numerosos factores, que difieren según la localización en el hospedador. Al penetrar, el parásito es reconocido como un agente extraño y activa una serie de mecanismos inmunológicos que varían considerablemente. Sin embargo, las infecciones parasitarias comparten algunas características comunes.

Entre los parásitos que muestran ciclos vitales complejos, algunos antígenos pueden ser específicos de una determinada fase del desarrollo. En las infecciones parasitarias crónicas, las consecuencias de la infección incluyen presencia de antígenos circulantes, estimulación antigénica persistente y formación de complejos inmunes. De modo general, los títulos de algunas inmunoglobulinas están elevados en algunas infecciones, la IgM en la tripanosomiosis africana y el paludismo, la IgG en el paludismo y la leishmaniosis visceral, y la IgE en las infecciones por helmintos.

Durante el proceso de invasión de un parásito, se produce una activación del sistema inmunitario adaptativo, en el que se ven involucradas las células T, anticuerpos etc., y varias clases de células efectoras, tales como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e incluso plaquetas, que ayudan al hospedador a defenderse del parásito. Muchas actividades antiparasitarias de las células efectoras se favorecen por la interacción de citocinas, liberadas por otros tipos de células en respuesta a la infección. Las citocinas se secretan mayoritariamente por linfocitos T y por macrófagos, pero otras pueden proceder de linfocitos B, de fibroblastos y de las células endoteliales de los vasos sanguíneos.

Los pacientes y animales de laboratorio infectados con *Echinococcus sp* expresan anticuerpos específicos, y originan reacciones linfocitarias ya que el parásito posee antígenos que son reconocidos por el hospedador, todo lo cual juega

un papel importante en el diagnóstico clínico de las infecciones por *Echinococcus*. En este sentido se han aislado y comparado muchos antígenos, ya que parte de la inmunoreactividad y detección de anticuerpos específicos depende de la fuente antigénica empleada.

2.2. Inmunología de la Hidatidosis.

Cualquier hospedador intermediario incluido el hombre, cuando está parasitado con la larva o hidátide de *Echinococcus granulosus*, se encuentra expuesto a una gran variedad de 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.

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 existencia de diferentes cepas del parásito, capaces de desarrollarse en distintos hospedadores intermediarios (Thompson, y col. 1977). Por otra parte, Kroeze y Tanner (1977) estudiaron, la diferente susceptibilidad que muestran los hospedadores, 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.

La hidatidosis humana es una enfermedad que se caracteriza por su curso crónico, desencadenando una intensa respuesta inmunitaria humoral con títulos elevados de anticuerpos específicos. También desencadena una respuesta inmunitaria celular con aparición de fenómenos de hipersensibilidad retardada. A estas dos situaciones hay que añadir la liberación ocasional de antígenos por parte del parásito.

2.2.1. Respuesta celular.

La respuesta celular del hospedador a la echinococosis, fué revisada por Siracusano y col. (1988). Ali-Khan y cols. (1983), describieron la patología de un órgano experimentalmente infectado, pudiendo diferenciar si la invasión se había 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 Tanner (1977) encontraron, que los macrófagos activados se adhieren al parásito, mientras que los no activados degeneran y mueren. Heath (1970) indicó 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 protoescólices 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*. (Cox y col., 1986).

Esta respuesta inmunitaria celular específica no se correlaciona con el título de anticuerpos circulantes, y no todas las fracciones antigénicas del líquido hidatídico son igualmente efectivas para estimular los linfocitos in vitro. La máxima eficacia se consigue utilizando aquellas fracciones antigénicas que posean los dos componentes mayores de *E. granulosus*: antígeno-5 y antígeno-B. Los extractos enriquecidos en antígenos con reacción cruzada con el grupo sanguíneo P1 no estimulan los linfocitos in vitro (Siracusano y col., 1988).

2.2.2. 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 (Cox y col., 1989; D'Amelio y col., 1989). 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 IgE (Abril y col. 1988).

2.2.3. 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) (Zhanqing y col., 1988). 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 (Larrand y col., 1984; Ferreira HB y Arnaldo Zaha, 1990).

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 viables (Tassi y col., 1984). La respuesta mediada por IgE puede detectarse por radioinmunolectroforesis (Yarzabal

y col., 1977), radioinmunoanálisis (RAST) (Falagiani y col., 1979), ELISA, o por degranulación de basófilos (Leynadier y col., 1980). Aunque estos anticuerpos IgE se producen frente a los dos complejos antigénicos mayores, el antígeno-5 es el más inmunógeno, y su detección aporta un diagnóstico de hidatidosis de elevada especificidad (Dessaint y col., 1975; Cesbron y col., 1986).

2.2.4. Inmunocomplejos circulantes y reacciones de autoinmunidad.

La presencia de inmunocomplejos circulantes es un hallazgo frecuente en los pacientes con hidatidosis (Pini y col., 1983; Richard-lenoble y col., 1978), pero no guarda relación con la detección de anticuerpos específicos frente a *E. granulosus* (Craig y Nelson, 1984), siendo más frecuente su detección cuando existe rotura o fisuración del quiste. Cualquier clase de inmunoglobulina puede formar parte del inmunocomplejo pero predomina la IgG. La presencia de IgM o de IgA en ellos sugiere infección activa (D'Amelio y col., 1989; Craig PS, 1986).

La aparición de factores reumatoides frente a diferentes isotipos de inmunoglobulinas y de anticuerpos anti-Fab, no es infrecuente y se han encontrado en otras situaciones en las que existe una respuesta humoral intensa (Nemazee y col., 1983), tras inmunización y tras la inoculación de inmunocomplejos preformados (Nemazee DA, 1985).

Además de las antiinmunoglobulinas se han detectado otros tipos de autoanticuerpos, que probablemente son consecuencia de la activación policlonal de los linfocitos B. Entre ellos podemos citar el anticoagulante lúpico, y los anticuerpos anti-HLA de clase I y de clase II (Agmelio y col., 1987).

Sin embargo, a pesar de la frecuencia con que se detectan autoanticuerpos e inmunocomplejos en los pacientes con hidatidosis, es infrecuente observar signos clínicos tipo enfermedad del suero, aunque se ha descrito una glomerulonefritis membranosa con detección de antígenos de *E. granulosus* en el glomérulo (Vialtel y col., 1981).

2.3. Constitución antigénica de *E. granulosus*.

Inicialmente se produce la invasión de las oncosferas, posteriormente se produce el desarrollo, llegando a formarse un quiste inmaduro, que finalmente da un quiste fértil en el estado de metacestode. En cada uno de estos estadios el hospedador se encuentra expuesto a diferentes determinantes antigénicos, frente a los cuales se producirán reacciones características. El estudio de los antígenos de *E. granulosus* se ha llevado a cabo predominantemente mediante ensayos basados en la producción de anticuerpos específicos. Estos estudios analizan la respuesta de anticuerpos en hospedadores infectados, así como en animales hiperinmunizados. Muchos autores demostraron que los antígenos mayoritarios, responsables de inducir la producción de anticuerpos, en hospedadores naturalmente infectados, son reconocidos por los anticuerpos de animales inmunizados. Por esta razón, el estudio del suero de animales infectados con el parásito juega un importante papel en la caracterización de los antígenos más específicos de *E. granulosus*, permitiendo una estandarización de tests de serodiagnóstico en la hidatidosis (Valera-Díaz y Coltorti, 1976).

Se han utilizado líquido hidatídico, protoescólices y membranas quísticas procedentes de diferentes hospedadores, como fuente de antígeno para realizar pruebas de diagnóstico. Generalmente, el líquido hidatídico se considera la fuente más importante de antígenos parasitarios (Kagan y Norman, 1961; Hariri y col. 1965; Craig y Rickard, 1981; Tassi y col. 1981).

La constitución antigénica de *E. granulosus* es compleja. Si se utilizan métodos de inmunotransferencia, pueden detectarse más de 40 antígenos diferentes en el líquido hidatídico. Algunos de los antígenos sintetizados por *E. granulosus* reaccionan de forma cruzada con antígenos del organismo hospedador (Pezzela y col., 1984), como la seroalbúmina (Bouchara y col., 1985; Pezzela y col., 1984a), o los antígenos de grupos sanguíneos (Russi y col., 1974). Estos antígenos no sólo se encuentran en el líquido hidatídico, sino

también en la lámina germinal, y pueden provocar fenómenos de escape inmunológico, autoanticuerpos y aparición de reacciones falsas positivas en las pruebas diagnósticas (Ben-Ismail y col., 1980).

2.3.1. Caracterización de los antígenos.

La caracterización de los componentes antigénicos específicos del quiste hidatídico ha sido realizada en gran parte, mediante la aplicación de técnicas tales como difusión en gel o inmunoelectroforesis (IEP), y utilizando sueros de hospedadores infectados o de animales inmunizados. Recientemente, estos estudios iniciales han sido complementados por técnicas de inmunotransferencia (Western blotting) e inmunoprecipitación en presencia de SDS-PAGE, anticuerpos monoclonales y por técnicas de ADN recombinante. Aunque quedan más aspectos que aclarar, estos procedimientos permitieron la caracterización definitiva de los antígenos identificados inicialmente por difusión en gel y IEP.

No más del 3 % de los componentes del líquido hidatídico son antígenos procedentes del parásito (D'Amelio y col., 1985), el resto del contenido proteico está formado por macromoléculas procedentes del organismo hospedador que llegan a él por difusión. Estas proteínas incluyen albúmina, alfa, beta y gammaglobulinas. En el líquido hidatídico de procedencia ovina, la concentración de inmunoglobulinas oscila entre 1,3 y 13 mg/l, y la seroalbúmina entre 3 y 34mg/l (Coltorti y Varela-Díaz, 1972). Estos mismos autores en 1974 determinan que la membrana cuticular es permeable a las macromoléculas, mientras que la lámina germinal es responsable de la permeabilidad selectiva a diferentes proteínas procedentes del organismo hospedador.

Los componentes parasitarios del líquido hidatídico proceden probablemente de la lámina germinal y no de los protoescólices, ya que su composición antigénica difiere de la de éstos (Dottorini y Tassi, 1978).

En este sentido, son necesarias investigaciones para conocer los mecanismos

responsables de la entrada de los componentes del hospedador en el quiste hidatídico, y de la presencia de antígenos circulantes parasitarios (Craig, 1986; Judson y col. 1985) en los sueros de hospedadores intermediarios.

2.3.2. Los antígenos mayoritarios.

Han sido descritos algunos antígenos específicos en el líquido hidatídico, y en extractos de tejidos del parásito (Kagan y Norman, 1.961, Norman y col., 1.964, Chordi y Kagan, 1.965, Valera-Díaz y col., 1.974). En 1.961, Kagan y Norman identificaron cuatro componentes antigénicos en el quiste hidatídico y tejidos de *E. granulosus* y *E. multilocularis*. En 1963, estos mismos autores encontraron una banda más frecuente, a la que designaron como P1. Los componentes más inmunoreactivos fueron parcialmente purificados utilizando dietil-aminoetil (DEAE) celulosa. Por otra parte, Chordi y Kagan en 1965 analizaron la respuesta de anticuerpos en sueros de pacientes frente al líquido hidatídico ovino, observando mediante inmunoelectroforesis cómo las bandas 4 y 5, (la nomenclatura dada en un primer momento no se correspondía con las observaciones posteriores), producían reacción con todos los sueros ensayados. Estas bandas fueron atribuidas definitivamente por Capron y col. en 1.970 como pertenecientes al parásito, mediante el estudio inmunoelectroforético con sueros de animales inmunizados con líquido hidatídico. Estos autores identificaron una línea de precipitación, a la que designaron fracción 5 o arco 5, muy específica. Estas bandas fueron designadas como antígenos A y B. La banda 4, antígeno A o P1 descubierta por Cameron y Staveley en 1957, fue denominada así por la semejante actividad antigénica que presentaba con el antígeno presente en la superficie de glóbulos rojos de determinantes individuales. Posteriormente, se determinó que este mismo antígeno estaba presente en las membranas de quistes hidatídicos, e inducía la producción de anticuerpos anti-P1 en pacientes infectados con el parásito y con el determinante sanguíneo P2.

Estos dos complejos antigénicos han recibido diferentes denominaciones y serían: - El antígeno de mayor tamaño denominado antígeno-A (Oriol y col. 1971), antígeno-5 (Capron y col. 1967, 1970) y antígeno-4 (Piantelli y col. 1977, Pozzuoli y col. 1975). - Y el antígeno de menor tamaño denominado antígeno-B (Oriol y col. 1971) o antígeno-5 (Piantelli y col. 1977, Pozzuoli y col. 1975).

Siguiendo la terminología más aceptada denominaremos antígeno-5 al de mayor tamaño, y antígeno-B al de menor tamaño.

El antígeno-5 es una lipoproteína que fija concanavalina-A, posee un peso molecular elevado de unos 400 kD y es susceptible de yodación. Está formado por subunidades de unos 60 a 70 kD que se encuentran unidas de forma no covalente. Cada una de estas subunidades puede ser reducida con 2-mercaptoetanol, dando lugar a dos monómeros de 40 a 50 kD y de 20 kD (D'Amelio y col., 1985; Shepherd y McManus, 1987).

Este antígeno-5 da lugar al arco-5 en las pruebas de inmunoelectroforesis, tiene actividad de alfa y beta-carboxilesterasa y es termolábil (Oriol y col., 1971; Bout y col., 1974).

Los estudios realizados con anticuerpos monoclonales frente a epítopos del antígeno-5, y con métodos de inmunotransferencia en presencia de SDS no permiten obtener una banda correspondiente a cada una de las subunidades, sino dos bandas de 56 y 66 kD. Tras la reducción con 2-mercaptoetanol, estas dos bandas desaparecen y el anticuerpo monoclonal no reconoce ningún otro péptido de peso molecular inferior, si bien los sueros policlonales reconocen una banda de 39 kD (Di Felice y col., 1986).

El antígeno-B es una lipoproteína que fija concanavalina-A, susceptible a la yodación y con un peso molecular de unos 150 kD. Está formado por tres subunidades de 12, 16 y 20 kD unidas de forma no covalente, no es afectado por la reducción con 2-mercaptoetanol y es termoestable.

Las características generales se representan en la tabla 2.1, donde podemos

observar ciertas diferencias entre los autores en la estimación del tamaño de las subunidades del antígeno 5, lo que refleja probablemente las diferentes condiciones y metodologías en las que se llevó a cabo los inmunoensayos electroforéticos.

2.2.3. Especificidad de los antígenos.

El antígeno-5 fue descrito en 1967 por Capron y col. como exclusivo y específico de *E. granulosus*, desde entonces la detección de anticuerpos frente a este antígeno por métodos de precipitación ha sido considerada como diagnóstico de certeza de infección por *E. granulosus*. La importancia diagnóstica del antígeno-5 ha sido confirmada posteriormente, aunque se han detectado anticuerpos frente a él por inmunoelectroforesis, en pacientes afectados de otras parasitosis por cestodes como *E. multiloculares*, *E. vogeli* y *Cisticercus cellulosae* (Schantz y col., 1980; Yarzabal y col., 1977), y por inmunotransferencia tanto en pacientes afectados de otras parasitosis como incluso en sueros procedentes de donantes sanos. Estas reacciones son causadas por anticuerpos dirigidos frente al hapteno fosforilcolina, ya que el antígeno-5 es una lipoproteína con el epítipo de la fosforilcolina. Por esta razón las reacciones cruzadas pueden inhibirse añadiendo a la reacción fosforilcolina soluble para que compita con los anticuerpos reactivos frente a ella (Shepherd y McManus, 1987).

El antígeno-B es menos inmunoreactivo que el antígeno-5 pero es mucho más específico de *E. granulosus*, habiéndose detectado únicamente reacciones cruzadas en sueros de algunos pacientes infectados por *E. multilocularis* o *E. vogeli* (Maddison y col., 1989).

Tabla 2.1: Características de los 2 antígenos mayoritarios del metacestode de *E. granulosus*.

Antígenos	Composición principal	Peso Molecular (kDa)	Subunidades (kDa)		Estabilidad antigénica a 100°C
			No-reducidas	Reducidas	
Antígeno 5	Lipoproteína ¹ Glicoproteína ²	400 ³ 100-300 ⁴	67 ^{6,7}	20, 47 ⁶	Labil ^{1,8,14,4,9}
			60 ^{8,9}	39 ¹⁰	
			69 ⁴	20, 38 ⁹	
			56, 65/66 ^{10,2}	24, 38 ⁹	
			64 ¹¹	22, 37 ¹¹	
			52, 62 ¹²		
Antígeno B	Lipoproteína ¹	160 ¹ 120 ⁵ 150 ³	10,5-20 ⁶	10,5-20 ⁶	Estable ^{1,14,9}
			8, 16, 24 ^{7,2}	8, 16, 24 ⁷	
			12, 16, 20 ¹³	12,16,20 ¹³	

¹(Oriol y col., 1971); ²(March y col., 1991); ³(Pozzuoli y col., 1972);

⁴(Dottorini y Tassi, 1977); ⁵(Oriol y Oriol, 1975); ⁶(Piantelli y col., 1977);

⁷(Lightowers y col., 1989b); ⁸(Bout y col., 1974); ⁹(Shepherd y McManus, 1987);

¹⁰(Di Felice y col., 1986); ¹¹(Chamekh y col., 1990); ¹²(Maddison y col., 1989);

¹³(D'Amelio y col., 1985); ¹⁴(Lauriola y col., 1978).

Desde la introducción de la inmunotransferencia, los estudios para el serodiagnóstico de la hidatidosis humana se enfocaron a valorar las subunidades del antígeno B. Inicialmente, Shepherd y McManus (1987) encontraron que la subunidad de 12 kDa es altamente específica de *E. granulosus*. Mientras, Lightowlers y col. (1989b) y Leggatt y col. (1992) confirman las reacciones cruzadas que esta subunidad muestra con sueros de pacientes con echinococcosis alveolar y cisticercosis.

Otros autores examinaron el valor diagnóstico de bandas de bajo peso molecular (Siracusano y col. 1991), Maddison y col. (1989) identificaron un antígeno de 8 kDa que se detecta solamente con sueros de pacientes con echinococcosis. Sin embargo, mediante inmunoblot utilizando la fracción purificada por Oriol y col. (1971), Siracusano y col. (1991) determinaron que la molécula de 39 kDa del antígeno 5 es más reactiva y sensible (89%) que las subunidades del antígeno B (55%).

Las características de los antígenos descritas por Shepherd y McManus (1987), Leggatt y col. (1992) y Maddison y col. (1989) aparecen consistentes y coincidentes con las subunidades del antígeno B. Es muy interesante constatar que los diferentes laboratorios involucrados realicen estudios comparativos de estos antígenos, determinando con claridad su similitud.

March y col. (1991) demostraron, mediante el estudio de los carbohidratos asociados a los antígenos 5 y B, como el antígeno 5 fija concanavalina-A mientras el antígeno B no muestra tener carbohidratos y por tanto no fija concanavalina-A. Esta observación se contradice con los trabajos de Pozzuoli y col. (1975). Posiblemente la subunidad de alto peso molecular del antígeno B está asociada a los carbohidratos de forma no covalente, por lo cual se disocia en presencia de SDS (Lauril sulfato sódico).

Es considerable la proporción de pacientes con hidatidosis en los que han podido detectar antígenos e inmunocomplejos circulantes (Craig y Nelson, 1984;

Gottstein, 1984; D'Amelio y col., 1989).

Han sido utilizados métodos de inmunotransferencia para identificar y detectar los antígenos parasitarios formando parte del inmunocomplejo (CIC). Kanwar y Vinayak (1992), han identificado un antígeno que incluye un componente de 8 kDa, posiblemente relacionado con la pequeña subunidad del antígeno B. Bonifacino y col. (1993), realizaron un estudio detallado en el que pudieron caracterizar parcialmente dos bandas antigénicas de 50 y 62 kDa, después de someter el CIC a cromatografía (FPLC), y proceder a la detección por inmunoblot. Sin embargo D'Amelio y col. (1989), no han podido detectar ningún antígeno en el CIC, utilizando 5 diferentes métodos analíticos muy sensibles.

Por otra parte, empleando anticuerpos monoclonales frente a los antígenos 5 y B, Liu y col. (1993) identificaron una pequeña proporción de pacientes con uno o ambos antígenos circulantes. También observaron que la proporción de muestras positivas en los ensayos con anticuerpos monoclonales era considerablemente menor que la detectada por otros autores con anticuerpos policlonales, en los ensayos de captura de los antígenos circulantes.

La existencia de diferencias entre el espectro de los antígenos circulantes y el de los del quiste hidatídico, sugiere la existencia de mecanismos responsables de su aparición en la circulación distintos de una simple fisuración del quiste.

2.3.4. Otros antígenos.

Muchas otras técnicas han sido utilizadas para obtener fracciones antigénicas semipurificadas para el inmunodiagnóstico.

Hamel y Ris (1982) describieron un antígeno denominado "antígeno catódico", aparentemente útil para el diagnóstico de la hidatidosis en ovejas.

Han sido empleadas técnicas de purificación mediante cromatografía de afinidad, de los antígenos utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales, para procesar los diferentes antígenos (Craig y col. 1980, 1981; Gottstein y col. 1983;

Rickard y col. 1984; Di Felice y Siracusano, 1987; Liu y col., 1992a,b,c).

Recientemente, el análisis por inmunotransferencia de los antígenos del quiste hidatídico ha permitido identificar una serie de moléculas antigénicas. Algunas de estas moléculas fueron caracterizadas en términos de la sensibilidad y especificidad que mostraban para la detección de anticuerpos anti-*E. granulosus* en los sueros de pacientes. Kanwar y col. (1992), y Al Yaman y Knobloch (1989) describen componentes antigénicos con potencial serodiagnóstico, y que presentan similitud con el antígeno B. Otros componentes han sido caracterizados, 48 kDa por Al Yaman y Knobloch, (1989) y 116 kDa por Kanwar y Vinayak, (1993). Maher y col. (1992) identificaron un complejo de 52-62 kDa, que puede ser la forma no reducida del antígeno 5.

En condiciones no reductoras, Queralt y col. (1989) detectaron una banda de 85 kDa por inmunoblot, utilizando antígenos de líquido hidatídico humano semipurificado, de igual intensidad al antígeno 5, y mostrando gran sensibilidad y especificidad.

2.4. EL Diagnóstico de la Hidatidosis.

2.4.1. Diagnóstico Molecular.

En la década pasada se desarrollaron técnicas inmunoquímicas y de ADN que fueron aplicadas al campo de la parasitología. Estas técnicas han dado lugar a herramientas de estudio que han mejorado la caracterización de antígenos de *Echinococcus* y la mejora de los tests de diagnóstico. El ADN recombinante junto con las técnicas de anticuerpos monoclonales empiezan a desvelar las características de los antígenos a nivel de epítipo o de aminoácidos. Sin embargo la caracterización molecular de los antígenos de *Echinococcus* no ha hecho más que empezar, y las relaciones entre proteínas recombinantes y las homologías con sus proteínas nativas no resultan fáciles de resolver.

Las técnicas de biología molecular han permitido la identificación de especies, e incluso estadios, mediante la secuenciación de sus ácidos nucleicos. La aplicación de esta tecnología está limitada por su complejidad técnica, y se centra principalmente en la caracterización de aislados o cepas de *Echinococcus*, dando información de tipo epidemiológico en vez de clínico. Se han desarrollado varias sondas de ADN utilizadas por varios grupos para caracterizar, identificar o agrupar diferentes cepas de *E. granulosus* (Rishi y McManus, 1987; Yap y col., 1988; Lyubery y Thompson, 1989).

Aparte de la limitada disponibilidad de estas sondas, el mayor problema reside en la limitada sensibilidad de la hibridación y la técnica de marcaje utilizada. Estas limitaciones han sido superadas mediante la aplicación de una nueva técnica, la PCR. Su sensibilidad puede incrementarse aún más mediante técnicas complementarias, como la reamplificación con "primers" internos, o hibridación "Southern blot" con sondas marcadas.

2.4.2. El diagnóstico inmunológico de la hidatidosis.

Casi todos los ensayos serológicos disponibles han sido utilizados para diagnosticar la hidatidosis. Hay considerables diferencias entre los ensayos, tanto en su capacidad para detectar los anticuerpos específicos en el suero de pacientes (sensibilidad), como en su poder para discriminar entre pacientes con equinococcosis, y aquellos con otras parasitosis o patologías. Conforme se incrementa la sensibilidad del ensayo, la investigación sobre mejores antígenos crece, con el fin de alcanzar mayor sensibilidad y especificidad.

El objetivo principal del presente capítulo es examinar las técnicas modernas y los nuevos hallazgos relacionados con las mismas.

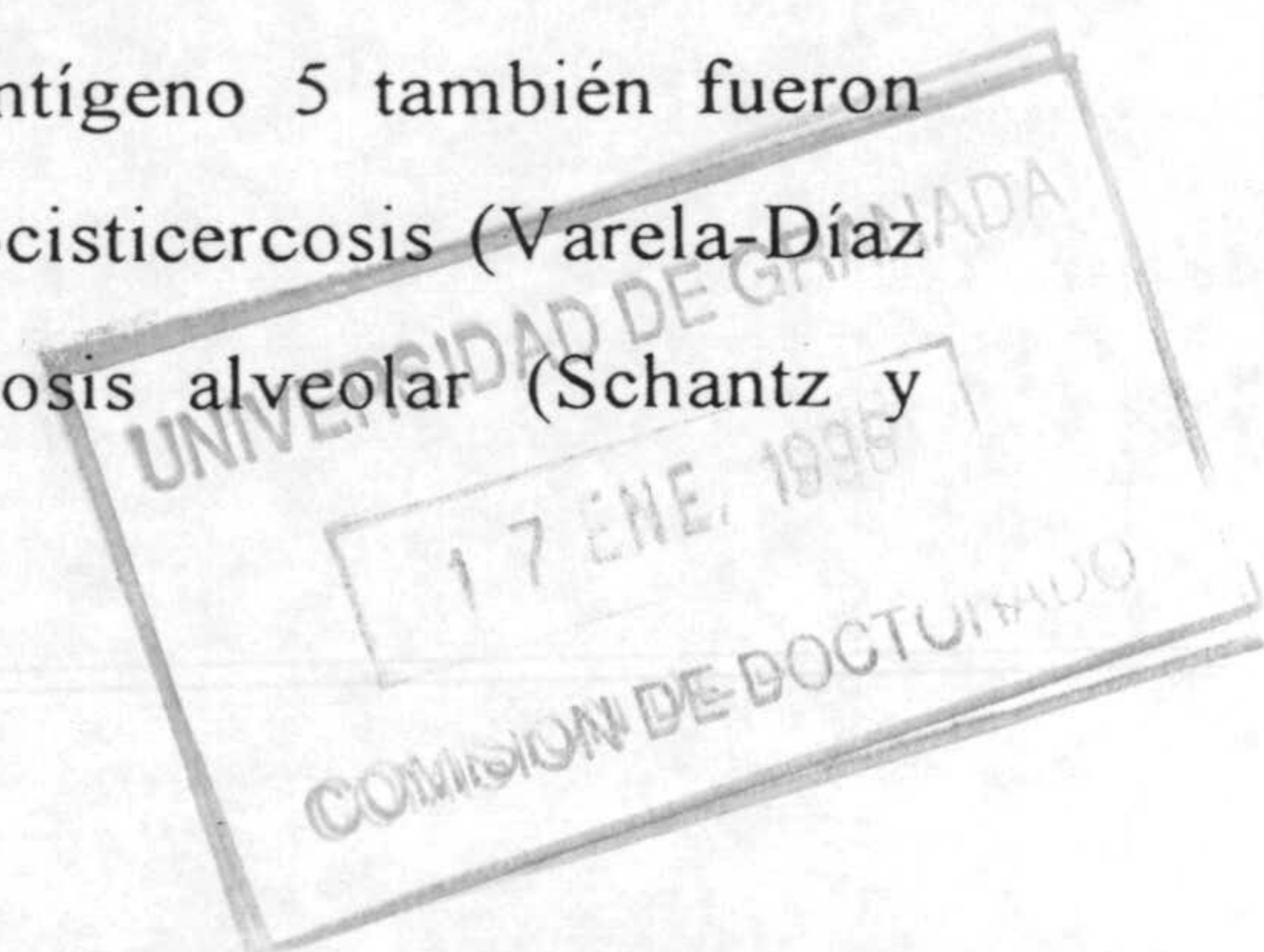
Recientemente se ha prestado mucha atención a los siguientes ensayos: ELISA, inmunofluorescencia indirecta, ensayos de inmunoprecipitación, tales como IEP o electrosinerosis; inmunotransferencia (Immunoblotting), y otros, que abarcan

técnicas modernas para mejorar la sensibilidad y la especificidad.

Hay numerosos factores que deben tenerse en cuenta, a la hora de determinar cuál o cuáles de los ensayos serán de más utilidad en una determinada situación. Consideraciones prácticas, tales como la disponibilidad del dispositivo para llevar acabo los ensayos o para purificar los antígenos, las condiciones bajo las cuales se pretende llevar acabo los ensayos, y la experiencia de los operadores, pueden ser las consideraciones claves en el proceso de elección. La sensibilidad y especificidad del diagnóstico de la mayoría de los ensayos varían considerablemente en función de: (i) la naturaleza, pureza y calidad del antígeno, (ii) la naturaleza de las inmunoglobulinas (isótopos, etc.) y (iii) la sensibilidad metodológica de la tecnología elegida (Gottstein, 1992).

2.4.2.1. Detección de anticuerpos para el diagnóstico clínico.

La respuesta inmunológica en pacientes que sufren la hidatidosis ha sido utilizada ampliamente para diagnosticar la enfermedad. La mayoría de los ensayos serológicos, para el inmunodiagnóstico de la equinococcosis unilocular, utilizan antígenos de *E. granulosus* para la detección de anticuerpos en el suero. El líquido hidatídico ha sido empleado como una fuente principal fácilmente disponible de antígenos, y se considera relativamente sensible (75%-94%) en el ensayo IHA y ELISA (Gottstein, 1992b). Una de las características más específicas, para el serodiagnóstico de la hidatidosis, cuenta con la demostración de que los anticuerpos del suero precipitan el arco 5 (anticuerpos específicos del antígeno 5) por IEP, o por otra técnica semejante (Capron y col., 1970). Los estudios experimentales indican que los anticuerpos frente al antígeno 5 se encuentran entre los primeros que se detectan después de la infección (Capron y col., 1970; Yong y Heath, 1979; Conder y col., 1980). Sin embargo, los anticuerpos frente al antígeno 5 también fueron detectados en sueros procedentes de pacientes con neurocisticercosis (Varela-Díaz y col., 1978; Moro y col., 1992), y con equinococcosis alveolar (Schantz y



Gottstein, 1986). A pesar de las investigaciones adicionales utilizando anticuerpos monoclonales y técnicas de inmunotransferencia (Di Delice y col., 1986; Chamekh y col. 1990, 1992), es evidente la falta tanto de especificidad a nivel de la especie, como de la sensibilidad del diagnóstico debido a la ausencia de anticuerpos anti-antígeno 5 en una cierta proporción de pacientes.

Se han realizado muchos intentos para caracterizar e identificar los componentes antigénicos de *E. granulosus* que presentan las características óptimas en el diagnóstico. La resolución del líquido hidatídico por SDS-PAGE permitió identificar por inmunoblot, componentes relativamente específicos y que tenían diferentes tamaños moleculares (Maddison y col., 1989; Kanwar y col., 1992; Verastegui y col., 1992) tal como ya hemos discutido anteriormente. Otros procedimientos para mejorar las características de los ensayos serológicos de *E. granulosus*, fueron la fraccionación de los antígenos utilizando técnicas cromatográficas. Estas proporcionan entre otros un antígeno de 20 kDa parcialmente purificado, semejante al antígeno B. Se ha postulado que este antígeno fuera específico a nivel de la especie *E. granulosus* (Al Yaman y Knobloch, 1989). No obstante, su utilidad inmunodiagnóstica queda por demostrar en evaluaciones futuras. Una mejora de la sensibilidad (93%) se consiguió combinando el antígeno 5 con el antígeno B mediante ELISA y utilizando anticuerpos monoclonales (Liu y col., 1992a,b,c).

La demostración de IgE específica ha llamado especialmente la atención, debido a su relevancia conocida en helmintiasis (Matossian y col., 1972; Pinon y col., 1987; Wattal y col., 1988), pero no aportó ninguna ventaja significativa en el inmunodiagnóstico. La determinación de IgE específica puede tener un valor potencial para estimar los riesgos relativos a las reacciones anafilácticas por ruptura del quiste (Blasco Navalpotro y col., 1993). La unión de la IgE a los basófilos se manifiesta provocando la liberación *in vitro* de histaminas específicas al antígeno (Leynadier y col., 1980; Sacdpraseuth y col., 1981; Aceti y col., 1992).

Tanto las variaciones en la cepa del parásito como las diferencias en la

relación parásito-hospedador pueden influir en la respuesta serológica. Así, por ejemplo, estudios realizados en Kenia describen muchos casos de hidatidosis hepática, en los cuales los ensayos serológicos convencionales para la detección de anticuerpos no han sido muy útiles (Chemtai y col., 1981).

Los principales problemas de sensibilidad y especificidad que presenta el diagnóstico debidos a las reacciones cruzadas parecen estar relacionados no con infecciones heterólogas por otros helmintos sino, con la presencia de anticuerpos anti-P1 (Ben Ismail y col., 1980b), autoanticuerpos, cirrosis hepática, (Iacona y col., 1980) etc. En resumen, la estrategia actualmente recomendada para el inmunodiagnóstico de la hidatidosis es la utilización de un ensayo sensible, tal como la ELISA, empleando antígenos del líquido hidatídico. En los resultados positivos se debe tener en cuenta el origen geográfico del paciente, y los posibles problemas de reacciones cruzadas. Consecuentemente, el diagnóstico se debe confirmar posteriormente con ensayos que demuestren respuesta de anticuerpos frente al antígeno 5, u frente a otros componentes antigénicos específicos de los descritos anteriormente.

2.4.2.2. Seroepidemiología.

El diagnóstico precoz de los pacientes asintomáticos es un requisito para un tratamiento eficaz de la enfermedad. Se realizan por ello estudios seroepidemiológicos en muchas zonas. Los ensayos más ampliamente utilizados se basan en la detección del arco 5, debido a su especificidad relativamente buena en las áreas no endémicas para *E. multilocularis* (Schantz y Gottstein, 1986). No obstante, muchos estudios han demostrado claramente los límites del uso único de la serología en los estudios epidemiológicos; esto es el caso sobre todo de las áreas donde la seropositividad es baja, tal como en la comarca de Turkana en Kenia (Craig y col., 1986). Consecuentemente, estudios recientes han empleado una estrategia en el diagnóstico basada en el examen por ultrasonidos de la hidatidosis

abdominal, combinada con el inmunodiagnóstico (Macpherson y col., 1987; Coltorti y col., 1988), resultando ser una combinación fiable, especialmente útil para la detección de los quistes hepáticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Material biológico utilizado.

3.1.1. Material parasitario.

Líquido hidatídico de dos procedencias ha sido empleado como fuente antigénica.

- Líquido hidatídico (LH) y protoescoleces de origen humano, suministrados por el hospital Ibn Sina Rabat, Marruecos. El líquido ha sido centrifugado a 2000g durante 30 min a 4°C, dializado, liofilizado y almacenado a -80°C. Los protoescoleces han sido homogeneizados y sonicados. El sobrenadante obtenido tras la centrifugación (10.000g, 30 min), ha sido dializado frente a tampón Fosfato salino pH 7.4 conteniendo 0.02% de azida sódica. Luego se almacena a -20°C.

- Líquido hidatídico de origen ovino suministrado a nuestro laboratorio por los laboratorios GIRESA de Madrid, procedente de mataderos locales. Previamente a la utilización, el LH se centrifuga a 4000g durante 30 min, añadiéndosele al sobrenadante azida sódica a 1g/l y 5mM de EDTA (Acido Tetraacético Etilendiamina), para prevenir la actividad de proteasas. Repartiéndose en alicuotas de 100 ml de volumen, manteniéndose a -20°C.

Extractos y líquido vesicular de cisticerco, fueron obtenidos a través el Instituto de Biomedecina, Universidad Autónoma de Mexico.

3.1.2. Sueros.

Los sueros humanos empleados han sido un total de 38 distribuidos:

- 20 sueros de pacientes con hidatidosis confirmada quirurgicamente, con presencia de títulos variados de anticuerpos. 11 de ellos proceden del hospital Virgen de las Nieves de Granada y los otros 9 del hospital Ibn Sina de Rabat (Marruecos).
- 4 sueros de pacientes con cisticercosis, 4 de pacientes con toxoplasmosis y 4 con leishmaniosis, todos ellos proceden del hospital Virgen de las Nieves de Granada.

- 6 sueros de donantes sanos.

3.2. Precipitación de proteínas.

Siguiendo el método propuesto por Schleif (1981), alícuotas de 100 ml de líquido hidatídico fueron tratadas con sulfato amónico ($\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$) (MERCK) al 70% de concentración (P/V) agitándose durante 15 minutos y almacenándose a 4°C durante un tiempo mínimo de 12 horas. Tras esto, se centrifugó a 16.000 rpm y a 4°C, en una centrifuga BECKMAN (J2-21M). El sobrenadante fue retirado cuidadosamente, y el precipitado se sometió a diálisis.

3.3. Eliminación de las sales por diálisis.

Se utilizaron membranas de diálisis suministrada por Medicell International LTD, con tamaño de poro entre 5 y 8 kDa. La activación de las membranas se realizaba siguiendo el método descrito por Schleif y Wensink (1981).

El método consiste en varios lavados de las mismas con solución EDTA 0,2M en agua bidestilada a ebullición. Luego se lavan y se almacenan a 4°C en una solución al 0,1% de EDTA 0,2M, hasta su uso.

La solución que contiene las proteínas se introduce en las membranas, mediante una pipeta Pasteur y se dializan frente a un volumen de 2 litros de agua destilada, con cambios de agua cada tres horas, durante unas 72 horas. Al cabo de este tiempo, concentrándose posteriormente mediante liofilización, congelándose a - 80°C para ser utilizado y estudiado en posteriores ensayos experimentales.

3.4. Determinación de la concentración de proteínas.

Para determinar la concentración total de proteínas se ha utilizado el método de Micro-Lowry (Lowry y col. 1951).

La reacción de Lowry para la determinación de proteínas es una modificación del procedimiento de biuret. El primer paso implica la formación de un complejo de cobre proteína en una disolución alcalina. La reacción de biuret para la determinación de proteínas fue uno de los primeros métodos desarrollados para el análisis colorimétrico de proteínas y todavía goza de un extenso uso hoy en día. Se emplea con más frecuencia en aplicaciones que requieren rapidez, pero no elevada exactitud.

3.4.1. Método de Micro-Lowry.

En los casos en que la cantidad de proteínas a determinar es muy pequeño o existen problemas de interferencia de alguna sustancia en el medio se utiliza este método según Findlay, J.B.C. (1986).

Se basa en la medida del color resultante de la reacción de Biuret de los enlaces peptídicos con el cobre en medio alcalino y de la reducción del reactivo de Folin.

3.4.1.1. Reactivos.

Disolución A: Carbonato sódico al 2 % (p/v) en hidróxido sódico 0.1 M.

Disolución B: Sulfato de cobre al 0.5 % (p/v), Tartrato sódico-potásico al % (p/v).

Disolución C: Se prepara mezclando las disoluciones A y B en proporción 50:1 (v/v). Esta disolución se puede utilizar durante un día.

Disolución D: Reactivo de Folin-Ciocalteu comercial diluido 1:1 (v/v).

Disolución E: Lawril sulfato sódico al 10 % (p/v).

3.4.1.2. Procedimiento.

A una muestra de proteína se le añade agua destilada hasta un volumen de 0,200 ml. A continuación se le añaden 1 ml de disolución C, se agita y se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente, seguidamente se añade 0,1 ml de disolución D y E, se agita y dejándose reposar 30 minutos, tras los cuales se mide

la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm en un espectrofotómetro Milton Roy (Spectronic 3000).

La curva patrón se obtiene realizando este procedimiento con una disolución de seroalbúmina bovina (BSA) de 1 mg/ml, de la que se toman volúmenes entre 2 y 32 μ l.

Con los valores de la densidad óptica de los patrones se construye una recta de regresión por el método de los mínimos cuadrados y su correspondiente correlación lineal, representando densidades ópticas frente a la cantidad de proteínas. Extrapolando los valores de las cubetas problema a la recta patrón, se obtiene la concentración de proteínas de la muestra.

Para estimar de forma tan rápida la concentración proteica se utiliza la siguiente relación descrita por Leslie Hudson, Frank C.Hay, (1989):

$$\text{Concentración proteica (mg/ml)} = 1,55 \times A_{280} - 0,77 \times A_{260}$$

A_{280} : Valor de la absorbancia a 280 nm

A_{260} : Valor de la absorbancia a 260 nm

3.5. Técnicas cromatográficas.

Las proteínas pueden interaccionar con un gran número de fases sólidas, por lo general, de forma selectiva. Por ello el uso de técnicas cromatográficas, permite discriminar entre diferentes tipos de proteínas y tiene una gran aplicación en la purificación de las mismas, especialmente aquellas que se llevan a cabo sobre una columna. En general, el uso de las técnicas cromatográficas en una etapa de la purificación supone un gran incremento en la pureza de la proteína.

Nosotros hemos aplicado diferentes técnicas cromatográficas para purificar proteínas y caracterizarlas. A continuación pasamos a reseñar brevemente los tipos de cromatografías utilizadas y la preparación del material cromatográfico, así como algunas características técnicas de interés.

3.5.1. Cromatografía líquida convencional.

En este apartado se describirán aquellos materiales cromatográficos en los que el desarrollo de la cromatografía se puede llevar a cabo pasando el líquido a través de la columna por la acción de la gravedad. Por motivos de control de la elución y comodidad se han utilizado de forma general bombas peristálticas para llevar a cabo las eluciones. También se han utilizado colectores de fracciones y detectores de flujo continuo para medir la absorbancia a 280 nm y de esta forma obtener el perfil de la elución.

3.5.1.1. Cromatografía de afinidad.

La base de las técnicas de cromatografía de afinidad es fijar covalentemente las moléculas a reconocer a una matriz sólida inmóvil. Una mezcla que contenga la macromolécula deseada se deja que filtre a través de esta matriz. La gran mayoría de las moléculas no tienen afinidad por la molécula unida o ligando y fluyen a través de la matriz sin retenerse. La macromolécula deseada no obstante reconoce la molécula unida, uniéndose a ella. Después de que todos los componentes no deseados se han eluido de la columna, las condiciones de la disolución de lavado se modifican para originar la disociación de la macromolécula del ligando unido. La macromolécula deseada en consecuencia aparece en el eluyente purificada.

Debe hacerse un planteamiento cuidadoso antes de llevar a cabo procedimientos específicos de laboratorio. Las principales consideraciones incluyen:

- El tipo de matriz utilizada.
- La naturaleza del ligando y medios de unión covalente a la matriz.
- Las condiciones utilizadas para absorber y eluir la macromolécula deseada de la columna.

Aunque algunas pautas generales son útiles, debe recalcarse que las condiciones necesarias para purificar una determinada macromolécula deben hacerse específicamente en función de las propiedades biológicas de la molécula.

- Matriz cromatográfica.

Las características deseadas de una matriz para la cromatografía de afinidad se parecen en muchos aspectos a las requeridas por un medio de tamiz molecular:

- Absorción inespecífica baja.
- Características para mantener un buen flujo.
- Estabilidad química y mecánica en un amplio rango de pH, fuerzas iónicas y concentraciones desnaturizantes.
- Disponibilidad, en gran cantidad de grupos químicos capaces de ser activados.
- Porosidad alta.

- Selección del ligando.

La selección del ligando a utilizar en la construcción de una columna requiere una consideración cuidadosa.

- 1) El ligando debe tener capacidad para ligar de forma específica y reversible la sustancia a purificar.
- 2) El ligando deberá tener grupos químicamente modificables que queden retenidos a la matriz sin destruir su capacidad ligante.

El ligando debe tener una constante de disociación comprendida entre 10^{-4} y 10^{-8} M. Envoltentes con constante de disociación superiores a 10^{-4} M, por ejemplo la reacción de unión entre un enzima y un inhibidor pesado, no constituye base para una buena cromatografía.

Es importante considerar la región del ligando que se une a la matriz, si existen varios grupos funcionales, el ligando se debiera acoplar a través del grupo que sea menos probable que intervenga en la interacción específica con la molécula a ser aislada.

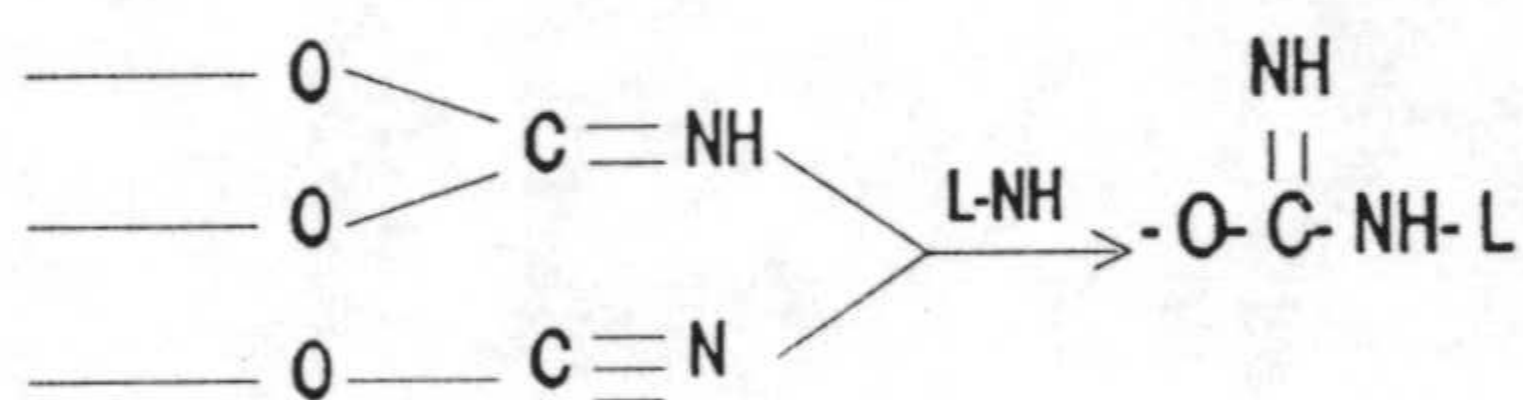
- Montaje de las adsorbentes.

Los procedimientos utilizados para unir covalentemente el ligando a la matriz

implican: La activación de los grupos funcionales de la matriz y la unión del ligando a estos grupos activados. Las reacciones químicas utilizadas para producir la unión deben ser lo suficientemente suaves para que sean toleradas bien, tanto por el ligando como por la matriz. Una vez unida la matriz soporte debe lavarse exhaustivamente para eliminar cualquier ligando libre y debe determinarse la cantidad de ligando unido. Esta última medida es más útil expresarla en términos de calidad por mililitro de matriz de relleno más que en su peso seco.

Como matriz se ha empleado CNBr Sepharosa 4B activada, que es un derivado pre-activado, que reacciona espontáneamente con ligandos que tienen grupos amino libres, produciéndose un acoplamiento rápido y fácilmente controlable del ligando a la matriz mediante enlaces covalentes.

Esta reacción resulta de la introducción de grupos reactivos, probablemente imidocarbonato y grupos cianato. El acoplamiento de un ligando con grupos amino libres a la CNBr-Seph 4B activada, lo podemos esquematizar así:



Los grupos imidocarbonato o éster cianato de la matriz, se acoplan al ligando a través de los grupos amino libres, en condiciones suavemente alcalinas para dar uniones del tipo de la urea.

La CNBr Sepharosa 4B activada, se adquiere en paquetes de 15g conteniendo una serie de sustancias conservantes, y se debe mantener a temperatura de 4-8°C hasta su uso. En estas condiciones, puede conservarse al menos durante 18 meses.

Toda clase de ligandos (de bajo peso molecular), que tengan grupos amino primarios, tales como proteínas, pueden quedar acoplados cuando usamos una matriz de este tipo. Las condiciones óptimas como son pH, temperatura, concentración, composición del tampón etc..., dependen de las propiedades del ligando en particular

que pretendemos usar.

Los ligandos que hemos utilizado han sido:

- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgA humana (Dakopatts).
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgE humana (Dakopatts).
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgM humana (Dakopatts).
- IgA de suero de pacientes purificada por cromatografía de afinidad (figura 3.1).
- IgE de suero de pacientes purificada por cromatografía de afinidad (figura 3.1).
- IgM de suero de pacientes purificada por cromatografía de afinidad (figura 3.1).
- Extractos homogenizados de quiste hidatídico de ratón.
- Extractos homogenizados de tejido de ratón (huésped).
- Una fracción llamada suero específico obtenida por cromatografía de afinidad (ver figura 3.2).
- Una fracción llamada suero inespecífico obtenida por cromatografía de afinidad (ver figura 3.2).
- Proteína-A (Sigma).
- Anti-P1 (Gamma Biologicals, Inc).

Para la preparación del adsorbente con un ligando determinado, se deben seguir los siguientes pasos:

1) Pesar la cantidad necesaria de CNBr Sepharosa 4B activada, sabiendo que 1g de la misma da aproximadamente 3ml de gel. En nuestro caso, preparamos 0,5ml de gel para lo cual pesamos 0,166g del producto seco.

2) Hinchar el gel con HCl 1mM (200ml/g) durante 15 min.

3) Lavar después de hinchar el gel, se puede realizar sobre un filtro de vidrio poroso, adicionando alícuotas de HCl 1mM sobre el gel. El uso de HCl para lavar, preservar y proteger los grupos reactivos del gel que se hidrolizan a pH alto.

4) Disolver el ligando, en el tampón acoplador a una concentración de 5-10mg de proteína por ml de gel. Los tampones que contienen amonio o grupos amino (glicina, acétato amónico, tris o bicarbonato amónico) deben evitarse porque competirán con el ligando. Los tampones de borato o bicarbonato sódico son

adecuados.

Tampón acoplador: NaHCO_3 0,1M, NaCl 0,5M, pH 8-9.

5) El gel activado y lavado se resuspende en un volumen igual del mismo tampón que contiene el ligando deseado. Esta mezcla se agita lentamente durante 16 a 20 horas a 4°C , quedando unido covalentemente al medio soporte. No es recomendable el uso de agitadores magnéticos porque podrían destruir las bolitas.

El proceso de acoplamiento es eficaz en un rango de pH entre 8 y 9, donde los grupos amino del ligando están predominantemente en la forma no protonizada. El acoplamiento a pH más bajo (pH 6), puede ser útil si un ligando queda muy fuertemente retenido a pH más alto con lo cual su actividad biológica empeora.

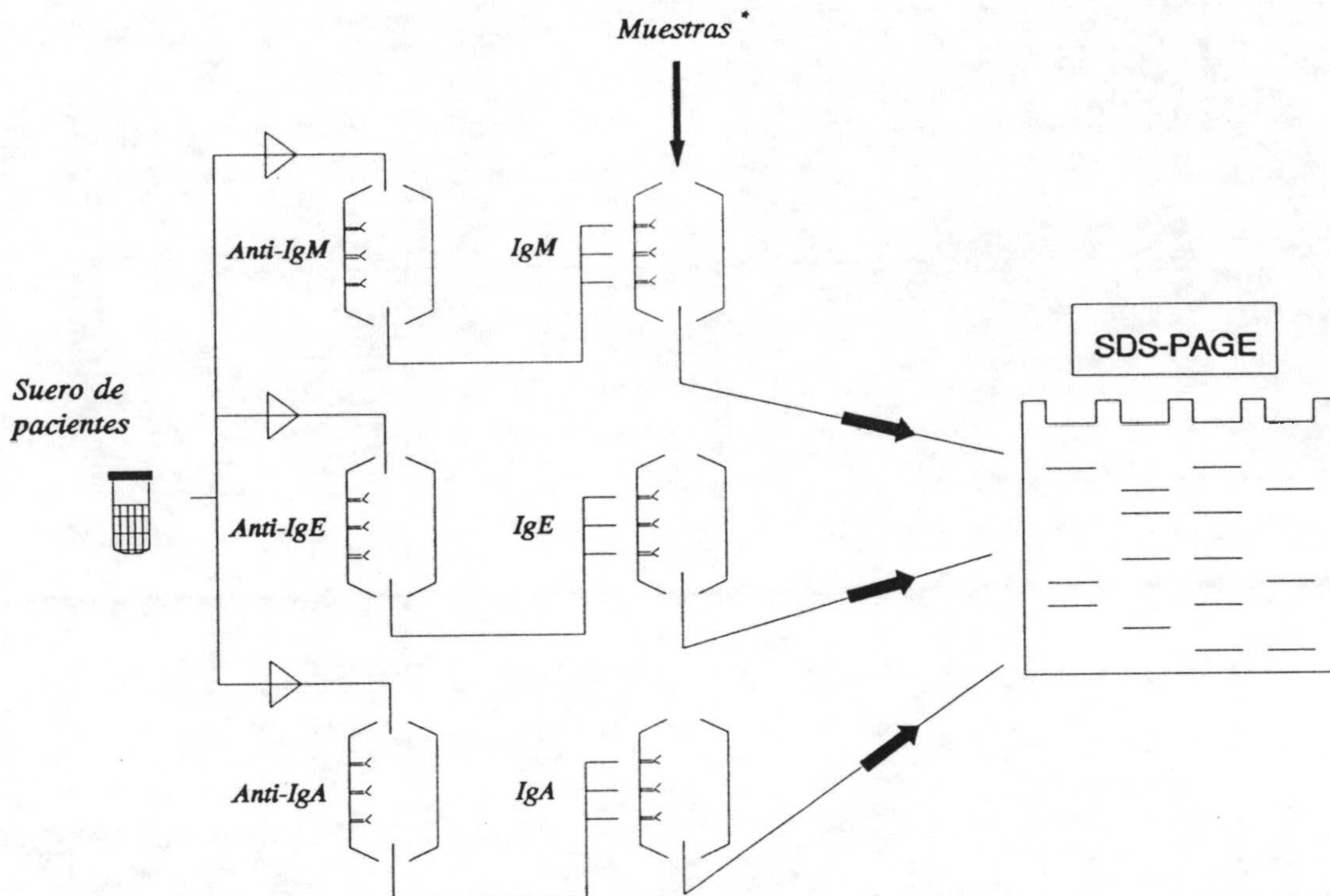
6) La producción de una afinidad absorbente es la eliminación del ligando no unido. Aunque se espera que los grupos activados de la Sepharosa no perduren por más de 12 horas, es conveniente bloquear el absorbente a temperatura ambiente con una disolución tampón Glicina 0,1M de pH 9, agitándose suavemente. Esto asegura que cualquier posible grupo activado superviviente sea bloqueado. Tras lo que se efectúa un exhaustivo lavado.

- Proceso de purificación.

Para llevar a cabo los procesos de cromatografía y su monitorización, hemos utilizado el equipo de Pharmacia Fine Chemicals compuesto por:

- Un monitor de ultravioleta UV-1 compuesto, a su vez, por una unidad óptica con una célula de flujo y una longitud de onda de operación de 280 nm, y una unidad de control ajustada a una sensibilidad de 0.1 unidades de absorbancia (UV).
- Un colector de fracciones FRAC-100 programable, acoplado a la unidad de control del monitor.
- Un registrador gráfico acoplado también a la unidad de control.

Figura 3.1: protocolo general 1.



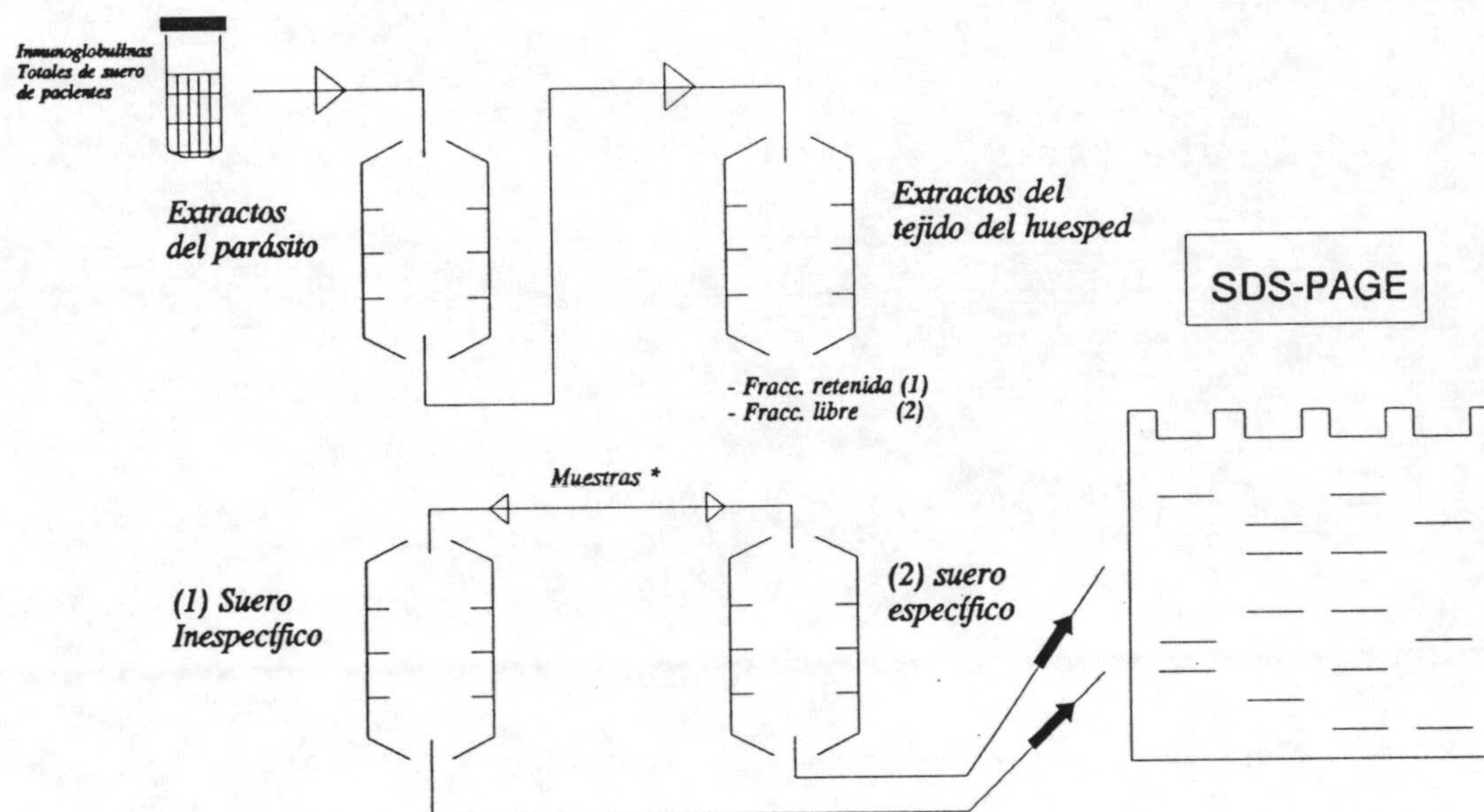
(*) Líquido hidatídico (total y Frac. proteica) humano, suero de pacientes con hidatidosis, suero de donantes sanos, líquido vesicular de cisticerco y el homogeneizado total de cisticerco.

Una vez montada y conectada la columna, se procede a equilibrar haciendo pasar el tampón fosfato salino (PBS) a pH 7.4 a través la columna a una flujo de 10 ml/h. Tras equilibrar la columna y ajustar la línea base se procedió acromatografiar la muestra correspondiente (ver la figura 3.1, 3.2).

- Tras lavar la columna pasando a través de ella PBS (pH 7.4) para remover completamente la fracción no ligada, realizamos la elución pasando a través la columna el tampón de elución compuesto de Glicina-HCl 0.1M a pH 3, para obtener la fracción reconocida específicamente. Tras lo que fue regenerada la columna.

La fracción eluida entonces, se neutraliza con Tris (pH 8) y se concentra mediante diálisis y liofilización.

Figura 3.2: protocolo general 2.



(*) Líquido hidatídico (total y Frac. Proteica) y el homogeneizado total de protoescolices de origen humano.

3.5.1.2. Cromatografía en gel de Concanavalina A-Sepharosa.

Concanavalina A es una lectina hemaglutinante aislada de *Canavalia ensiformis* (Jack bean), que aglutina de forma específica a ningún grupo sanguíneo pero tiene afinidad por restos terminales 1-D manosil, 1-D-glucosil y 1-D-N-Acetilglucosamina, en orden decreciente de afinidad.

Para su actividad son necesarios los iones Ca^{++} y Mn^{++} . La ConA-Sepharosa se suministra en tampón acetato (0,1M, pH 6) conteniendo (1M NaCl, 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 1mM MnCl_2 , Merthiolato 0,02%) por Pharmacia, presenta una gran afinidad y es fundamentalmente aplicable en:

- La separación y purificación de glicoproteínas, polisacáridos y glicolípidos.
- Purificación de conjugados enzima- anticuerpo.
- Aislamiento de glicoproteínas de superficie celular a partir de membranas solubilizadas.

En base a esto, quisimos realizar la purificación de las glicoproteínas

presentes en el líquido hidatídico, y posteriormente estudiar su composición y su valor antigénico.

Para ellos, y después de lavar y equilibrar la columna en tampón de lavado (Tris-HCl 0.02M, NaCl 0.5M, pH 7.4) ajustando el flujo a 5ml/h, hicimos pasar el LH diluido en tampón de lavado através la columna. La cromatografía se monitorizó de forma similar a la descrita en el apartado anterior.

Tras recoger la fracción no ligada a la columna, realizamos la elución de las glicoproteínas unidas a la Con A.

Elución: Se han hecho muchos estudios sobre métodos de eluir la fracción glicoproteica, y se han descrito varios procesos, pero la elución competitiva es el método más específico y suficiente para liberar las macromoléculas ligadas a la lectina del absorbente. Consiste en hacer que fluya através de la columna, el azúcar específico de la lectina empleando un gradiente de metil-Ó-D manopiranosido (0.1-0.4M, Sigma) en tampón Tris, con lo cual éste se une específicamente a la lectina saliendo la fracción de macromoléculas que estaban retenidas.

Tras cromatografiar la muestra las columnas fueron regeneradas de la siguiente manera:

- 1) Lavar con 10 volúmenes de la columna de tampón Tris 0,1M con NaCl 0,5M, a pH 8.5.
- 2) Lavar con 10 volúmenes de Tampón acetato sódico 0,1M con NaCl 0,5M, ajustando el pH a 4,5.
- 3) Re-equilibrar la columna.

De esta forma, la columna queda lista para volver a ser usada, mientras se almacena a temperatura inferior a 8°C con 0,02% de Azida sódica.

3.5.1.3. Cromatografía de exclusión molecular.

Este tipo de cromatografía permite la separación de proteínas en función de su peso molecular, así como el intercambio de tampones en los que se encuentran disueltas las proteínas, mediante el retardo en la elución de las sustancias de menor

peso molecular.

Con este método, se pretendió separar determinantes de alto peso molecular de la fracción antigénica (AgB,5) purificada como se describe en el apartado 3.7 de material y métodos.

En este caso es imprescindible usar columnas largas (normalmente del orden de 1m), y que la columna tenga un empaquetado uniforme. El volumen de la muestra aplicado no debe superar el 5% del volumen total de la columna. En nuestro caso hemos utilizado el sephadex G-75 con un rango de separación entre 3 y 70 kDa. El sephadex se suministra en polvo, y para su utilización es necesario hincharlo en agua o tampón durante 24 horas a temperatura ambiente.

Una vez preparada y empaquetada la columna, se introdujeron 2ml de la muestra, manteniendo un flujo de $10\text{ml} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$. La monitorización de la recogida de fracciones se llevo a cabo utilizando el equipo de Pharmacia Fine Chemicals.

3.6. Precipitación del inmunocomplejo en los sueros de pacientes.

El enriquecimiento del inmunocomplejo en sueros de pacientes con hidatidosis ha sido llevado a acabo mediante precipitación con polietilenglicol (PEG) 6000 (2,5 % en tampón borato 0,1M pH 8,4) de acuerdo con el método de Creighton y col. (1973).

En la presente memoria hemos seguido el método descrito por Paganelli y col. (1981).

3.6.1. Procedimiento.

- 1) Mezclar 100 μl de suero con 100 μl de EDTA, 0,2M a pH 7,5 y 50 μl de PEG 6000 al 12% en tampón borato 0,1M a pH 8,4.
- 2) Incubar toda la noche a 4°C.
- 3) Centrifugar a 2000g durante 20 min a 4°C.

- 4) Poner los tubos en hielo picado y remover quitando el sobrenadante suavemente.
- 5) Resuspender el precipitado en 2,4% de PEG 6000 en tampón borato 0,1M a pH 8,4.
- 6) Centrifugar a 200g durante 20 min a 4°C.
- 7) Quitar el sobrenadante y disolver el precipitado en 100 µl de tampón borato, incubandolo una hora a 37°C, tiempo para disolver completamente el precipitado.

3.7. Método de purificación del complejo antigénico b y 5.

Es un método descrito por Rogan y col. (1990) basado en el método de Oriol (1971) y Williams (1971).

3.7.1. Procedimiento.

- 1) Concentración del líquido hidatíco por dialisis en Polietilenglicol 20.000.
- 2) Dialisis del L.H frente tampón acétato 0,005M pH 5 toda la noche.
- 3) Centrifugar a 50.000 g durante 30 min.
- 4) El precipitado se disuelve en tampón fosfato, 0,2M, pH 8, la preparación se hierve en el baño durante 15 min.
- 5) Centrifugar a 50.000 g durante 60 min.
- 6) El pelet se descarta, y el sobrenadante se pasa a través de una columna proteína A-sepharosa para remover y eliminar cualquier IgG contaminante. Al final se dializa frente a tampón fosfato salino pH 7,4. Esta fracción contiene mayoritariamente las subunidades del antígeno B.

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.

3.8. Electroforesis.

Las técnicas electroforéticas se han convertido en herramientas principales para la caracterización de macromoléculas y para determinar su pureza. El método se basa en el hecho de que moléculas tales como DNA, RNA y las proteínas poseen una carga eléctrica siendo capaces de moverse cuando se colocan en un campo eléctrico. No obstante, aquí sólo es significativa la carga neta de la molécula. Si una molécula de carga neta "q" se coloca en un campo eléctrico, se ejerce sobre ella una fuerza "F" que depende de la carga que posee la molécula y de la fuerza del campo en el que se ha colocado. Esto se expresa matemáticamente como:

$$F = \frac{E}{d} q$$

Donde "E" es la diferencia de potencial entre los electrodos y "d" es la distancia entre ellos. Si esta situación ocurre en el vacío, la molécula se aceleraría hacia el electrodo y finalmente, chocaría con él. Sin embargo, en disoluciones esto no ocurre porque la fuerza de empuje del campo eléctrico se opone al arrastre o fricción que hay entre la molécula acelerada y la disolución. La extensión del arrastre, descrita por la ecuación de Stokes, depende del tamaño, forma de la molécula y de la viscosidad del medio a través del que se mueve:

$$F = 6\pi r n v$$

Donde "F" es la fuerza de arrastre ejercida sobre una molécula esférica, "r" es el radio de la molécula, "n" es la viscosidad de la disolución y "v" es la velocidad a que se mueve la molécula.

En definitiva la velocidad a que se mueve la molécula es proporcional a la fuerza del campo y carga de la molécula pero es inversamente proporcional a su tamaño y a la viscosidad de la disolución.

Las primeras aplicaciones de los métodos electroforéticos se efectuaron en disoluciones de sacarosa. Sin embargo, la naturaleza embarazosa de estos métodos

y el costoso equipo necesario han limitado mucho su empleo. Pero fue la llegada de los geles de acrilamida lo que proyectó este método a la actual popularidad, donde la migración de macromoléculas a través del gel está fuertemente influenciada por la propia estructura del gel.

3.8.1. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en presencia de Lauril Sulfato Sódico (SDS-PAGE).

Los geles de poliacrilamida están formados por copolimerización de acrilamida y bis-acrilamida (N,N'- metilenbisacrilamida). La reacción es una vinil-adición - polimerización iniciada por un sistema generador de radicales libres. La polimerización es iniciada por TEMED (tetrametilendiamina) y persulfato amónico, el cual produce un radical libre persulfato que rodea y activa al TEMED. El TEMED actúa como un electrón carrier para activar los monómeros de acrilamida. Así, los monómeros activados reaccionan con monómeros inactivados para iniciar la elongación de la cadena del polímero, formando bucles cerrados y un complejo polimérico "membranoso" con una característica de porosidad que dependen de las características de polimerización y de la concentración de monómeros.

El dodecil sulfato sódico (SDS) es un detergente que permite la solubilización de las proteínas convirtiéndolas en más hidrófilas y en complejos fuertemente negativos. Así, la movilidad de estos complejos en una solución, depende únicamente del tamaño molecular.

Se usó esta técnica (SDS-PAGE) para detectar y caracterizar moléculas inmunoprecipitadas y otros antígenos previamente purificados.

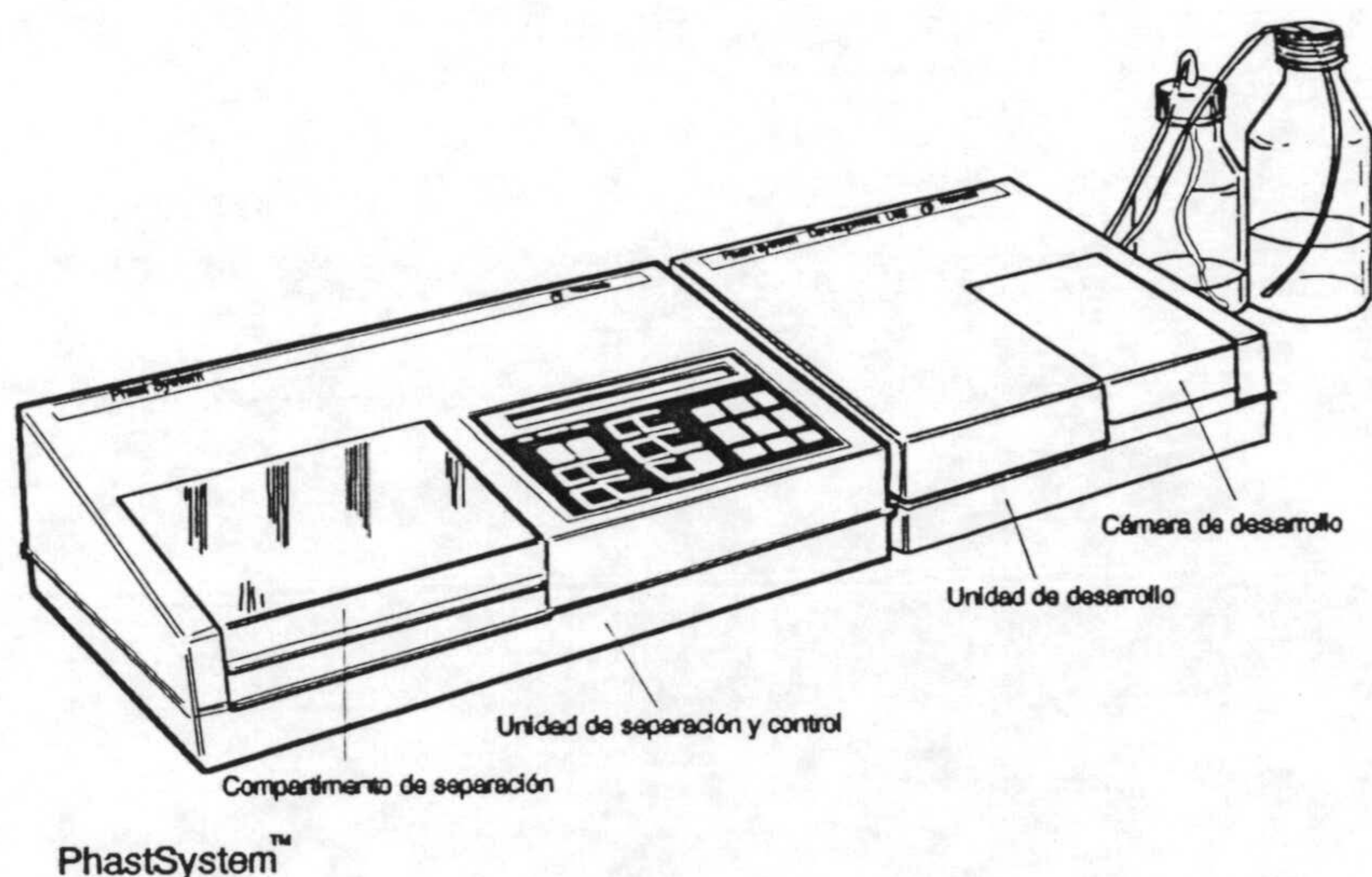
Hemos seguido el método de Laemmli, (1970) con ligeras modificaciones. En todos los casos se ha utilizado la electroforesis discontinua (Ornstein, 1964., Wyckoff, M. y col. 1977) que permite una mayor resolución en la separación de las bandas de proteína. En esta electroforesis, además de un gel separador, donde se realiza la separación de las proteínas en función de su peso molecular, se utiliza un gel almacenador sobre el mismo que es donde se aplica la muestra. Este gel

almacenador tiene un bajo porcentaje de acrilamida para que la exclusión molecular sea mínima. Las diferentes características de los geles almacenador y separador, además de la composición del tampón de desarrollo producen un estrecho apilamiento de las proteínas en el gel y las mismas llegan a la interfase de los geles almacenador y separador formando una estrecha banda lo que aumenta sensiblemente la resolución.

3.8.1.1. Aparato de electroforesis.

Tanto el corrido de los geles como su tinción, se realizó en el aparato PhastSystem™ (Pharmacia) que consiste en unidades de separación, desarrollo y de control, junto con varios accesorios para llevar a cabo la técnica electroforética en condiciones de alta resolución.

Esquema del aparato



3.8.1.2. Composición de los geles.

Se utilizaron geles de poliacrilamida al 12.5% comercializados por Pharmacia (PhastGel Homogeneous 12.5), en condiciones desnaturalizantes, estos geles permiten un rango de separación de 14-250 kDa. La zona del gel separador tiene una longitud de 32 mm y la del gel almacenador de 13 mm, con 0.45 mm de

anchura.

También se utilizaron pastillas de separación, igualmente comercializadas por Pharmacia (PhastGel SDS Buffer Strips), compuestas de tampón de electrodos en un 2% de agarosa, que se colocan en los extremos superior e inferior del gel.

- Reactivos.

Composición del gel y de algunas soluciones que fueron utilizadas durante la experiencia.

Solución A: Solución de acrilamida/Bis. 29.1g de acrilamida y 0.9g de Bis-acrilamida, en 100 mL de agua destilada. Disolver y filtrar. Mantener a 4°C en oscuridad, es estable durante 2 semanas.

Solución de persulfato de amonio (APS): Disolver 400 mg de persulfato de amonio en 1 mL de H₂O destilada. Estable durante una semana a 4°C.

Solución B: Tampón del gel almacenador. 6.06 g de tris, 0.4 g SDS y 0.01 g de azida sódica. Añadir hasta 80 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 6.8 con 4M HCl y completar hasta 100 mL con H₂O destilada.

Solución C: Tampón del gel separador (1.5M Tris-HCl, pH 8.8). 18.18 g de tris más 0.4 g SDS y 0.01 g de Azida sódica. Añadir hasta 80 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8.8 y completar hasta 100 mL con agua destilada.

Solución D: Tampón de electrodos. 3.03 g de tris, 14.4 g de glicina, 1 g SDS y 0.1 g de azida sódica. Añadir hasta 100 ml de agua destilada.

Solución E: Tampón de disolución de la muestra. 10 mM de tris/HCl y 1 mM EDTA a pH 8. Se le añade SDS al 2.5%, β-mercaptoetanol al 5% y el azul de bromofenol al 0.01%.

- Procedimiento de preparación de los geles y de las pastillas.

Se prepara el gel separador y almacenador mezclando volúmenes de las soluciones como viene especificado en la tabla 3.1.

Tabla 3.1: Volúmenes en mL de las soluciones necesarias para hacer un gel (12.5) en el sistema discontinuo de Laemmli.

	Solución del gel separador (12.5%)	Solución del gel almacenador (6%)
Glicerol	0.5	4
Soluc. A	4.16	2
Soluc. B	-	2.5
Soluc. C	2.5	-
Agua	2.84	1.5
TEMED	0.005	0.005

1) Para el gel separador a 5 mL se le añade 6 µl de APS, se mezclan y se introduce en el espacio entre las placas.

2) Se adiciona 2 µl de APS a 1.5 mL de la solución de gel almacenador, se mezclan y se vierte en la placa.

Se deja polimerizar durante 3 horas o preferiblemente toda la noche.

- Preparación de pastillas: Para 10 pastillas, se necesitan 30 mL de la solución con agarosa al 2%.

Pesar 0.6 g de agarosa en 15 mL de la solución D (Tampón de electrodos). Añadir agua destilada hasta 30 mL, hervir hasta disolver completamente la solución de agarosa, luego enfriar hasta 65°C y verter la solución en las casillas o estuches (PhastGel Buffer Strip case). Almacenar a 4°C.

3.8.1.3. Preparación y aplicación de las muestras.

Las muestras se diluyen a 1:1 en la solución E (Tampón de muestra) dando una concentración final entre 0.5 ng et 0.1 µg/µl. Tras ello, se agitan y se calientan en ebullición durante 5 min.

Después de colocar el gel y las pastillas de contacto, las muestras se pinchan con ayuda de un aplicador (PhastGel Sample Appl. 8/1, Pharmacia).

La separación se realiza en las condiciones siguientes, que se programan en la unidad de control del aparato (PhastSystemTM):

Paso 1*	250V	10.0mA	3.0W	15°C	1Vh
Paso 2	250V	1.0mA	3.0W	15°C	1Vh
Paso 3	250V	10.0mA	3.0W	15°C	70Vh

(*) El primer paso es un precorrido.

Transcurrido el tiempo de corrido, se extrae el gel y se procede a su colocación en la unidad de desarrollo para su tinción.

3.8.1.4. Tinción con nitrato de plata.

La técnica de tinción de plata descrita en este apartado, es derivada del método de Heukeshoven y Demick (1985), y ha sido optimizada por Pharmacia LKB Biotechnology.

Los procesos de tinción se realizan de una manera automática, tras su programación.

Soluciones*	Tiempo	Temperatura
Etanol 50%, Ac, acético 10%	2 min	50°C
Glutaraldehido 8.3%6	6 min	50°C
Agua desionizada	2 min	50°C
Agua desionizada	2 min	50°C
Nitrato de plata al 0.25%	13 min	40°C
Agua desionizada	0.5 min	30°C
Agua desionizada	0.5 min	30°C
Solución de desarrollo	0.5 min	30°C
Solución de desarrollo	4 min	30°C
Acido acético 5%	2 min	50°C
Acético 10%, glicerol 5%	3 min	50°C

(*) Las soluciones no deben reciclarse.

La solución de desarrollo se prepara disolviendo 25 g de Na_2CO_3 en 200 mL de agua bidestilada. A continuación se añaden 800 mL de agua bidestilada y 400 μl de formaldehido al 37%. Esta solución y la de nitrato de plata son extemporaneas con una duración máxima de 12 horas.

Una vez teñido el gel se extrae de la unidad de tinción y se seca a 30°C.

3.8.1.5. Cálculo del peso molecular por electroforesis en presencia de SDS (SDS-PAGE).

El peso molecular de las subunidades de una proteína se determina por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. La determinación de pesos moleculares de polipéptidos por electroforesis en presencia de lauril sulfato sódico (SDS) en geles de poliacrilamida (PAGE) fue introducida por primera vez, empíricamente por Shapiro y col. (1967). Se basa en que todos los polipéptidos unen la misma cantidad de SDS por unidad de peso (1,4 gramos de SDS por cada gramo de polipéptido) de forma que la relación carga/masa es constante y la estructura resultante es una varilla cuya carga global (negativa y debida fundamentalmente a la cabeza polar del SDS) es proporcional a la longitud. Cuando las mismas son sometidas a electroforesis en un gel, que actúa como tamiz, se demuestra empíricamente que existe una relación lineal entre la movilidad relativa (R_f) de estos polipéptidos y el logaritmo de su peso molecular.

Este tipo de electroforesis se utiliza para caracterizar las subunidades protéicas en función de sus pesos moleculares.

Para ello es necesario construir una recta patrón con proteínas de pesos moleculares conocidos. El cálculo del peso de las subunidades de la proteína problema se lleva a cabo midiendo los R_f de las bandas que presenta ésta y a partir de la recta patrón se obtiene los pesos moleculares (Wyckoff, M. y col. 1977).

El patrón de pesos moleculares se componía de las siguientes proteínas de referencia:

Albúmina bovina	-----	66.000	daltons	(Sigma)
Albúmina huevo	-----	45.000	»	»
pepsina	-----	34.700	»	»
Lactoglobulina	-----	18.400	»	»
Lysozima	-----	14.300	»	»

3.8.2. Isoelectroenfoque (IEF).

El isoelectroenfoque está clasificado dentro de las técnicas electroforéticas como una electroforesis en presencia de un gradiente de pH (Andrews, 1986). En este tipo de electroforesis las macromoléculas son sometidas a un campo eléctrico donde emigran en el gradiente de pH mientras presentan una carga neta, y cuando alcanzan el punto del gradiente de pH correspondiente a su punto isoeléctrico, donde la carga neta es cero, la migración cesa. El gradiente de pH se obtiene con una serie de sustancias anfotéricas o anfólicas de bajo peso molecular. Cuando el cátodo de una célula electrolítica se pone sobre una disolución de base fuerte y el ánodo en un ácido fuerte, y en el espacio entre ambos electrodos tenemos la disolución de anfólicas, éstas adquieren carga neta positiva en el área cercana al ánodo y carga neta negativa en el área cercana al cátodo. Si se establece una diferencia de potencial entre ambos electrodos, las anfólicas son repelidas por los electrodos y se moverán a una región central, hasta alcanzar un estado estacionario en el cual el pH del electrolito que rodea a la anfólica determinada es igual al punto isoeléctrico de la anfólica. De esta forma las anfólicas más básicas permanecerán cerca de la disolución básica del cátodo y las otras anfólicas se ordenan según su punto isoeléctrico hasta llegar a las anfólicas más ácidas que se situaran cercanas a la disolución ácida del ánodo.

Estas anfólicas deben cumplir una serie de requisitos para su uso en isoelectroenfoque, que son los siguientes (Andrews, 1986):

(1) Buena capacidad de tamponamiento, de forma que sean ellas las que impongan el pH en su punto isoeléctrico, incluso en presencia de anfólicas de alto peso molecular tales como las proteínas que pueden estar presentes en la misma zona.

(2) Buena conductividad en su punto isoeléctrico con el fin de mantener la conductividad eléctrica en ausencia de otros electrolitos.

(3) Bajo peso molecular para facilitar la separación de las macromoléculas estudiadas.

(4) Una composición que no interfiera con los ensayos utilizados para la

detección de las macromoléculas.

(5) No deben desnaturalizar o reaccionar con las macromoléculas a separar.

Las anfólicas que cubren estos requisitos suelen ser ácidos policarboxílicos o poliaminas, que pueden adquirirse a casas comerciales que la suministran bajo diferentes nombres.

El isoelectroenfoque puede llevarse a cabo en varios tipos de matrices como geles de poliacrilamida, de agarosa o geles granulados (Sephadex), y su elección depende del propósito para el cual se realiza el isoelectroenfoque.

El isoelectroenfoque es una técnica que permite una gran resolución en la separación de proteínas y péptidos según su punto isoeléctrico. Puede llegarse a obtener resoluciones de 0.01-0.02 unidades de pH. Esto hace del isoelectroenfoque una potente técnica analítica para estudiar la homogeneidad de muestras de proteína, o bien para analizar su composición.

La separación y tinción se realizó en el aparato PhastSystem™ (Pharmacia). Se utilizaron geles de poliacrilamida al 5% con un rango de pH entre 3 y 9 (PhastGel IEF 3-9) comercializados por Pharmacia Biotech., para determinar el carácter ácido o básico de las proteínas problema (Los inmunocomplejos circulantes, las fracciones antigénicas B y 5 del líquido hidatídico).

3.8.2.1. Composición y preparación del gel.

Para preparar 15 mL de gel, a 2.5 mL de la solución acrilamida/bis al 30% se le añade 0.75 mL de anfólicas o formalitos (3-9), llevar hasta 15 mL con agua. Adicionar 7 µl de TEMED, mezclar y degasear, y añadir 30 µl de APS (Persulfato amónico al 40%). A continuación se vierte el gel entre las placas y se deja polimerizar durante una hora. Conservar en humedad entre 4 y 8°C.

3.8.2.2. Procedimiento y aplicación de la muestra.

Hemos seguido el proceso descrito en el manual de Pharmacia (PhastSystem™

Separación Technique File No. 100). Se coloca el gel en el cámara de separación, e inmediatamente pinchamos las muestras (diluida adecuadamente en PBS) en un soporte plástico de aplicación (PhastGel, Sample Appl. 8/1), poniendo en un carril proteínas marcadoras de punto isoelectrico (Isoelectric Focusing Calibración Kit, Pharmacia). Colocamos el soporte con las muestras, en una posición media sobre el gel.

La separación se lleva a cabo bajo las condiciones siguientes, que se programan en la unidad de de control.

Paso 1	2000V	2.5mA	3.5W	15°C	75Vh
Paso 2	200V	2.5mA	3.5W	15°C	15Vh
Paso 3	2000V	2.5mA	3.5W	15°C	410Vh

El primer paso es un preenfoco de aproximadamente 10 min donde las anfolinas adquieren un estado estacionario creando así, el gradiente lineal de pH (Williams, et al. 1979).

En el paso 2, se depositan las muestran sobre el gel, a partir del cual se produce la separación de las bandas según su punto isoeléctrico.

Al final del proceso se extrae el gel y se procede a su desarrollo y tinción, para visualizar las bandas separadas en el gel.

3.8.2.3. Tinción con nitrato de plata.

La tinción con nitrato de plata detallada en este apartado para los geles de IEF, presenta ciertas modificaciones respecto a la utilizada para teñir los geles de electroforesis (SDS-PAGE), compensando así las diferentes propiedades existentes entre ambos geles.

La tinción se realiza de forma automática, después de programar en la unidad de control los pasos de tinción:

Soluciones*	Tiempo	Temperatura
Tricloroacético 20%	5 min	20°C
Etanol 50%, Ac. acético 10%	2 min	50°C
Etanol 10%, Ac. acético 5%	2 min	50°C
Etanol 10%, Ac. acético 5%	4 min	50°C
Glutaraldehído 8.3%	6 min	50°C
Etanol 10%, Ac. acético 5%	3 min	50°C
Etanol 10%, Ac. acético 5%	5 min	50°C
Agua desionizada	2 min	50°C
Agua desionizada	2 min	50°C
Nitrato de plata 0.5%	10 min	40°C
Agua desionizada	0.5 min	30°C
Agua desionizada	0.5 min	30°C
Sol. de desarrollo	0.5 min	30°C
Sol. de desarrollo	4 min	30°C
Acido acético 5%	5 min	50°C

(*) Las soluciones no deben recicladas.

La solución de desarrollo se prepara como viene en el apartado 3.8.1.4 de material y métodos.

Para la determinación de los puntos isoeléctricos (pIs) se construye una curva patrón con las distancias al cátodo frente a los pIs de cada proteína marcadora (Isoelectric Focusing Calibration Kit, Pharmacia). Se mide la distancia al cátodo del problema y se calcula su pI aproximado por extrapolación a la curva.

3.8.3. Electroforesis bidimensional (2D-PAGE).

La primera dimensión consiste en una separación de los polipéptidos mediante isoelectroenfoque (IEF) en gel de poliacrilamida y la segunda mediante SDS-PAGE en función del peso molecular.

En todo el proceso, hemos seguido las instrucciones descritas en el manual de Pharmacia (Two-dimensional electroforesis with PhastGel separation media. Technical Note No.2), basadas en el método descrito por Jägersten, C. y col. (1987).

3.8.3.1. La primera dimensión (IEF).

Se emplearon geles de poliacrilamida al 5% con un rango de pH 3-9, como viene descrito en el apartado... de material y métodos.

- Preparación y aplicación de la muestra.

Tampón de muestra:

- Urea	2,9g
- Nonidet P-40 10% V/V	0,1ml
- Amfolitos rango 3-9	0,1ml
- 2-mercaptoetanol	0,25ml
- Glicerol	0,1ml
- Agua bidestilada	5,0ml

La muestra se diluye en tampón de muestra, obteniendo una concentración de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se aplica la muestra utilizando un soporte de 6 dientes (PhastGel Sample Appl. 6/4) con capacidad de captar $4\mu\text{l}$ de muestra para cada pocillo. Inmediatamente, colocamos el soporte con las muestras en la cámara en una posición media sobre el gel.

El corrido se realizó en las siguientes condiciones:

Paso 1	200V	2.5mA	3.5W	15°C	30Vh
Paso 2	2000V	2.5mA	3.5W	15°C	770Vh

Para obtener mejores resultados, no se usó el pre-enfoque en este apartado, de acuerdo con los trabajos de Frey, y col. (1986).

Después de de la separación se extrae el gel, se corta cuidadosamente la tira del gel que contiene la muestra, y se trata con la solución de equilibrado como a continuación se detalla.

- Equilibración de las tiras.

1/ Equilibrar las tiras durante 2.5 min en la solución siguiente: Tris 0.112M, ácido acético 0.112M, 1% de DTT (Ditiotreitól) o 5% de β -mercaptoetanol y 2.5% SDS.

Esta fase sirve para lavar el gel, eliminar la urea y los amfolitos.

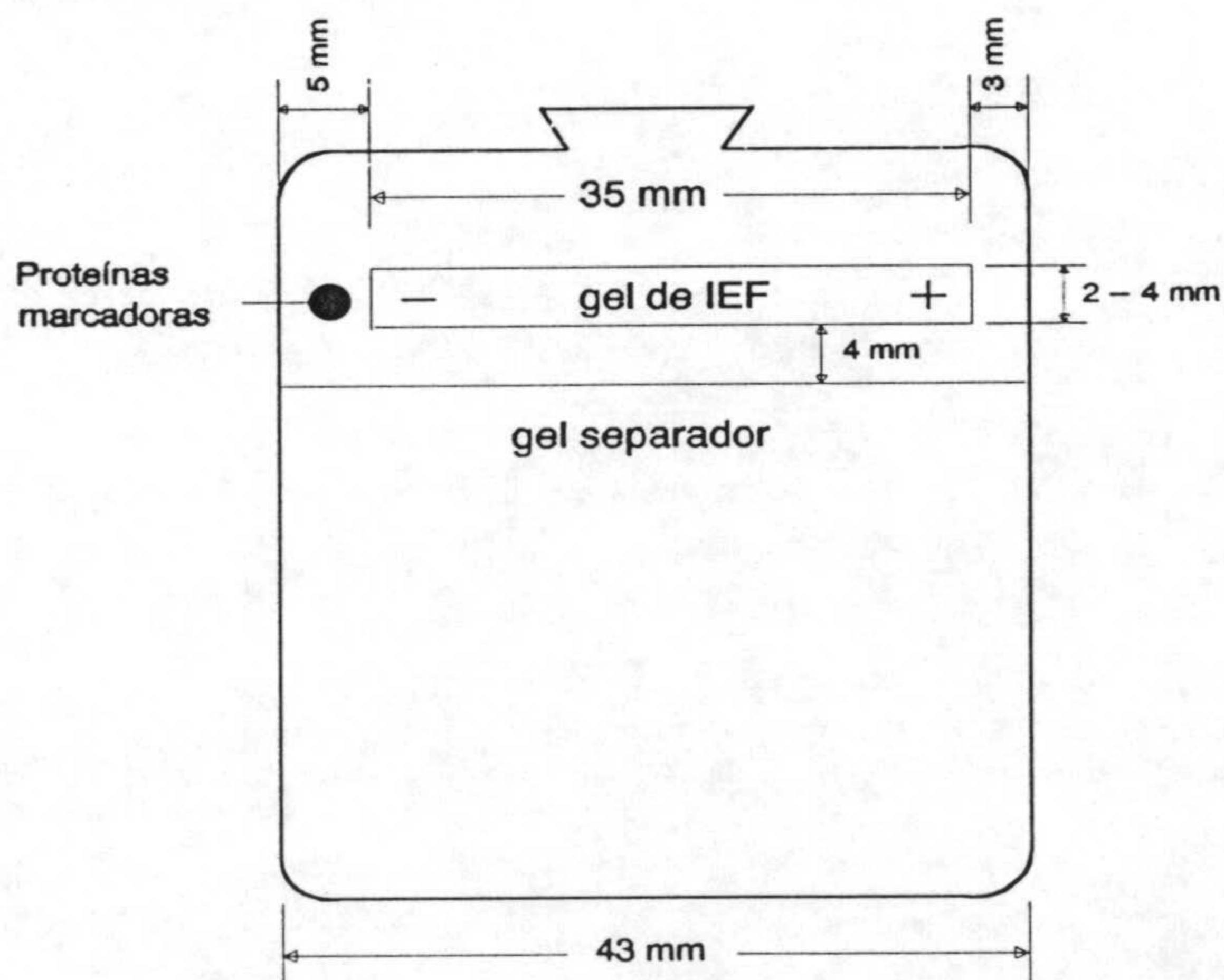
2/ Equilibrar de nuevo durante 2.5 min en la solución: Tris 0.112M, ácido acético 0.112M, 2.5% de SDS, iodo-acetamida 0.26M y 0.1% de azul de bromofenol, se ajusta el pH a 6.4.

Una vez equilibradas las tiras se procede a iniciar la segunda dimensión.

3.8.3.2. Segunda dimensión (SDS-PAGE).

La tira equilibrada se coloca sobre el gel de poliacrilamida al 12.5% (en la parte del gel almacenador), dejando un espacio para aplicar las proteínas marcadoras del peso molecular. Los detalles del proceso de colocación, se representan en la figura 3.3.

Figura 3.3:



Una vez colocada la tira, se insertan las pastillas de separación (SDS Buffer Strips, Pharmacia) en la cámara correspondiente. A continuación se procede a la separación aplicando las condiciones siguientes:

Paso 1	250V	2.5mA	3.0W	15°C	5Vh
Paso 2	250V	5.0mA	3.0W	15°C	5Vh
Paso 3	250V	10.5mA	3.0W	15°C	60Vh

Al final se extrae el gel y se coloca en la cámara de desarrollo para su tinción.

3.8.3.3. Tinción con nitrato de plata.

Para obtener mejor resolución, en la electroforesis bidimensional se ha elegido un método de detección con plata distinto que los métodos de tinción desarrollados en los apartados anteriores. Empleamos la metodología descrita descrita por Pharmacia LKB Biotechnology (PhastSystem Technical Note No. 2).

Para este propósito, se incubó el gel con las soluciones siguientes.

Soluciones*	Tiempo (min)	Temperat. (°C)
Metanol 40%, ac. acético 10%	5	30
Agua desionizada	5	20
Glutaraldehido 12.5%	7.5	20
Agua desionizada	5	20
Agua desionizada	5	20
Etanol 20%	7.5	20
Solución de plata	7.5	20
Etanol 20%	5	20
Etanol 20%	5	20
Solución de desarrollo	4.5-6	20
Ac. acético 10%, glicerol 5%	5	20

(*) Las soluciones no deben reciclarse.

La solución de nitrato de plata esta compuesta por: 1 ml de nitrato de plata al 20% + 1 ml de hidroxido amónico al 25% + 5 ml de NaOH + 93 ml de etanol al 20%.

La solución de desarrollo formada por: A 100 ml de etanol al 20% se le añade 100µl de formaldehido al 37% y 25µl de ácido cítrico 2,3M.

Estas dos soluciones son extemporaneas.

Al final se extrae el gel de la cámara de desarrollo del aparato y se deja secar.

3.9. Técnicas inmunológicas.

La gran especificidad, sensibilidad y resolución de las técnicas inmunoquímicas son el motivo de su gran aplicación en los últimos años a la resolución de problemas en bioquímica y biología molecular, ya que la especificidad de la unión antígeno/anticuerpo permite considerar a los anticuerpos como herramientas particularmente apropiadas para identificar y discriminar con exactitud cualquier molécula contra la cual se pueda producir un anticuerpo.

Las inmunoglobulinas o anticuerpos son un grupo de glucoproteínas presentes en el suero y los líquidos intersticiales de todos los mamíferos. Su producción es inducida cuando el sistema linfoide del huésped entra en contacto con moléculas extrañas inmunogénicas (antígeno), y se unen específicamente con el antígeno que indujo su formación.

3.9.1. Ensayo inmunoenzimático (ELISA).

ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) es un método sencillo y sensible capaz de detectar y cuantificar antígenos y anticuerpos. Existen varias formas de este tipo de ensayo entre las cuales las más importantes son el ELISA indirecto, ELISA competitivo y Dot-ELISA. Todos ellos se basan en la reacción de anticuerpos con el antígeno que indujo su formación, originando un complejo muy estable sobre una fase sólida y la detección del mismo mediante ensayos enzimáticos de una enzima previamente acoplada bien a los anticuerpos o al propio antígeno.

Se utilizó el standard micro-ELISA descrito por Rogan M.T y col. (1991) para estudiar la sensibilidad, especificidad y el valor diagnóstico de las fracciones antigénicas del LH.

3.9.1.1. Reactivos:

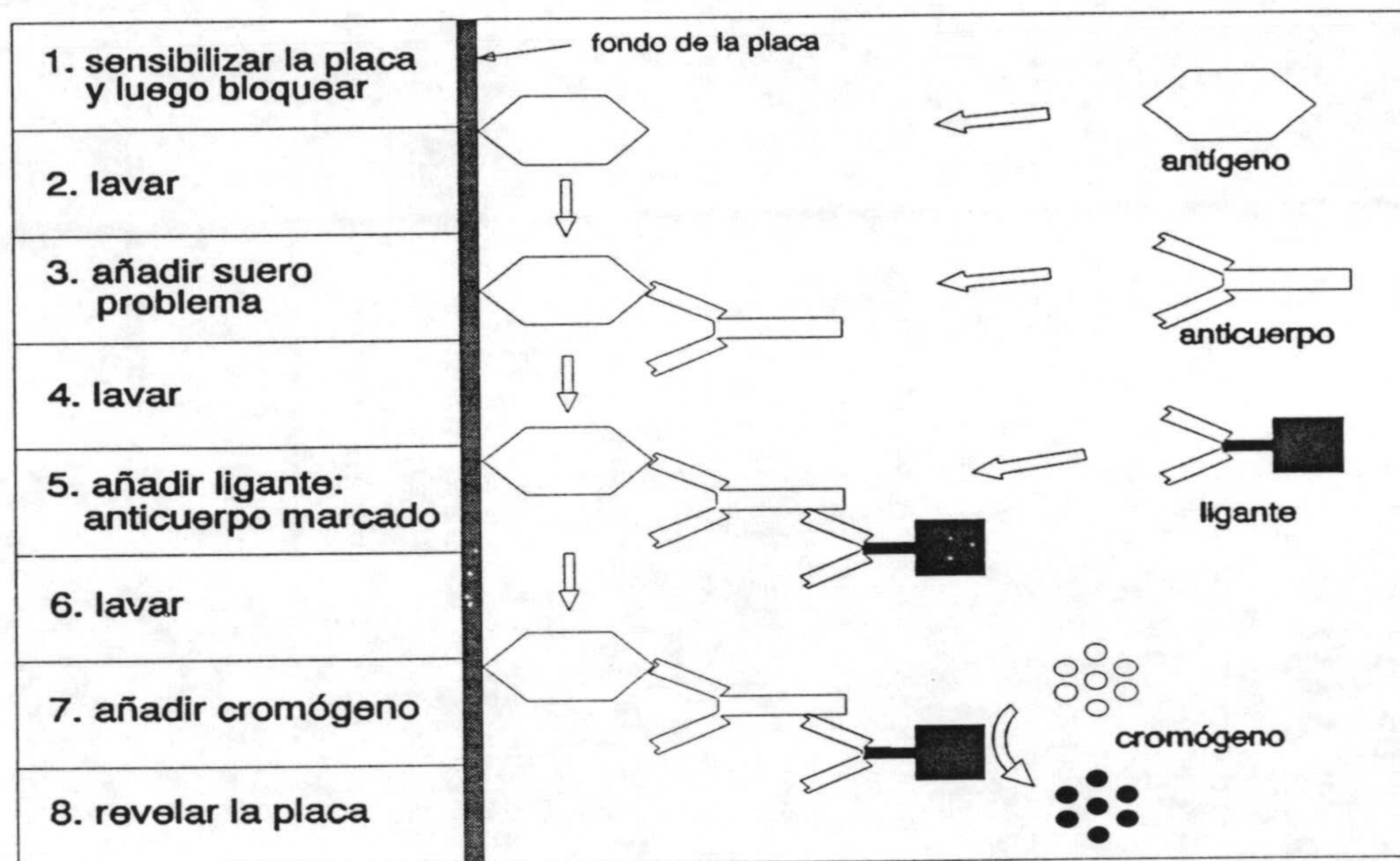
- Placa de microtitulación (Nunc, Denmark).
- Tampón de acoplamiento (Coating buffer): Na_2CO_3 , NaHCO_3 30mM a pH 9.6.
- Tampón fosfato salino (PBS) 0.15M: NaCl , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KCl , pH 7.4.
- Tampón de bloqueo, PBST: PBS con Tween 20 al 0.3%.
- Tampón de lavado y diluyente: PBS con Tween 20 al 0.1%.
- Inmunoconjugado utilizado: Anticuerpo anti-IgG humana (Fc específica) marcado con peroxidasa (Sigma Immuno Chemicals).
- Sustrato de peroxidasa: Disolver 3 mg de 3,3'-Diaminobenzidina tetrahidrocloride en 10 ml de tampón fosfato 10 mM (pH 6.8), conteniendo 0.01M de EDTA. Luego se adiciona 3 μ l de H_2O_2 al 30%. Filtrar antes de usar (Manual of Clinical laboratory Immunology. Third Edition. Noel R. Rose. pag. 106).

3.9.1.2. Procedimiento:

1. Se diluye el antígeno en "coating buffer" dando una concentración final de 20 μ l/ml. Se deposita 50 μ l en cada pocillo de la placa de microtitulación (poliestereno) y se deja en incubación a 4°C durante toda la noche.
2. Se lavan 3 veces los pocillos con tampón de lavado para remover los antígenos libres.
3. Después del tercer aclarado, se incuba la placa con 100 μ l por pocillo de tampón de bloqueo, durante 2 horas a 37°C.
4. Se desecha la solución la solución de bloqueo y se incuban los pocillos por duplicado, con 50 μ l de cada suero ensayado diluido 1:100 durante 2 horas a temperatura ambiente.
5. Se lava como en 2.
6. A continuación, se añade 50 μ l del inmunoconjugado diluido 1:800 en tampón diluyente durante 2 horas a temp. ambiente.
7. Se lava como en 2.

8. finalmente a cada pocillo, se le añade 50µl de la solución de sustrato de peroxidasa y se deja reaccionar durante 30 min, tras los cuales se para la reacción con H₂O destilada. A continuación se lee la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA (Kontron Analytical. SLT 210).

Figura 3.4: Descripción general, breve de los pasos en ELISA.



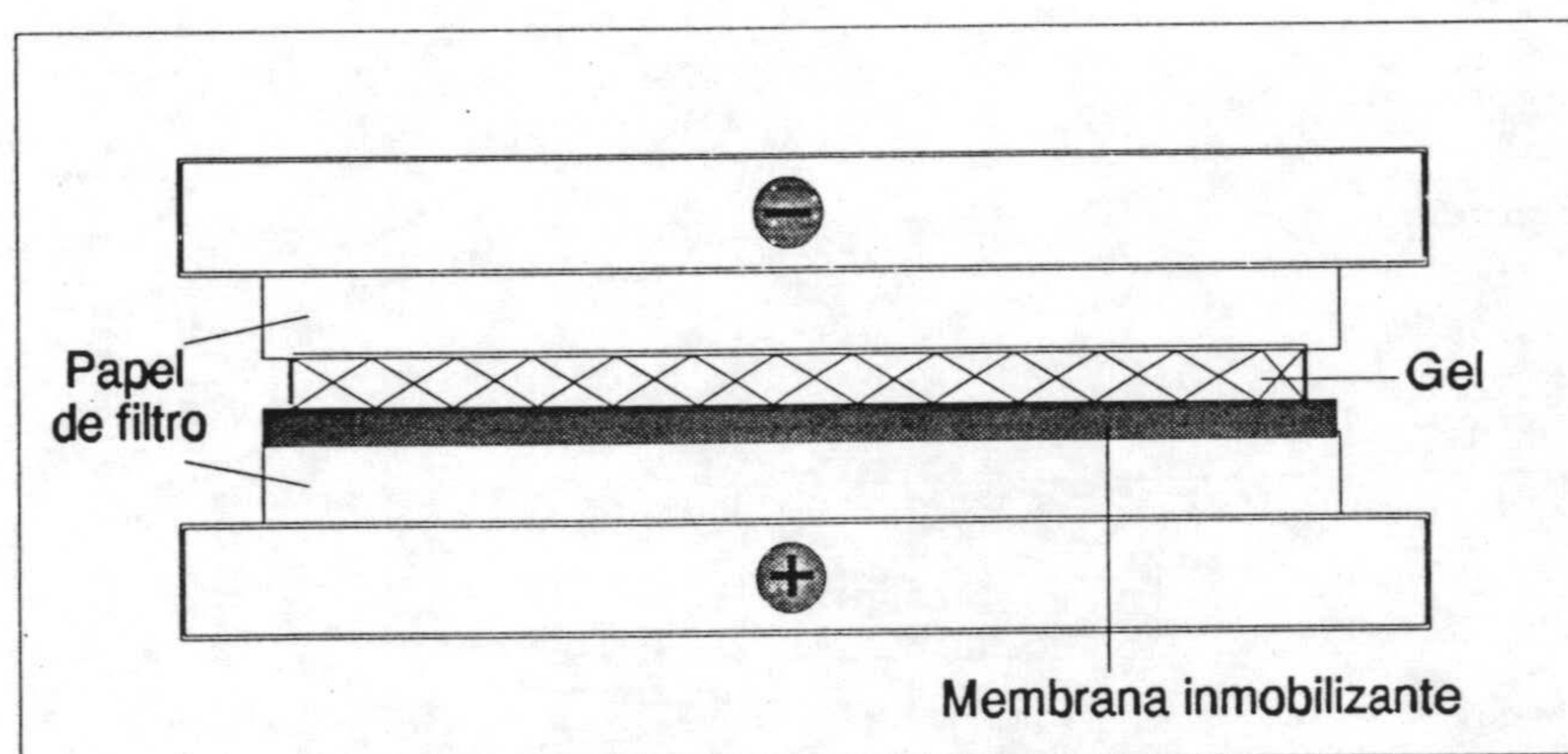
3.9.2. Inmunotransferencia (Immunoblotting).

La inmunotransferencia de proteínas fue introducido como una combinación de dos de las técnicas analíticas más importantes en los últimos 30 años; electroforesis en gel y el inmunoensayo. El método combina la capacidad analítica de la electroforesis con la sensibilidad y especificidad del inmunoensayo. Esta técnica fue descrita por primera vez en 1979 por varios grupos, especialmente por Towbin.

Para determinar el número, sensibilidad y la especificidad de las bandas (de las fracciones antigénicas utilizadas) que reconoce el suero de pacientes se llevó a cabo mediante el inmunoblotting. Esta técnica consiste en la transferencia (blotting)

de las proteínas separadas por una electroforesis en gel de poliacrilamida, a una membrana (nitrocelulosa, nylon o PVDF) capaz de ligar proteínas, y posterior identificación de las proteínas con los anticuerpos con un procedimiento idéntico al utilizado para la ELISA.

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5 % (PhastGel™, homogenous 12,5) (PhastSystem, Pharmacia LKB Biotechnology) según viene detallado en el apartado 3.8.1. Tras la electroforesis se procedió a la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. Se equilibró el gel y la membrana durante 15 minutos en tampón de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol al 20 % de pH 8,3), y a continuación se preparó un sandwich con la membrana de nitrocelulosa y el gel, como se esquematiza en la Figura 3.5:



El sandwich completo para la transferencia

El sandwich se introdujo en la cubeta de transferencia (Pharmacia LKB - PhastTransfer) con el lado del gel situado en el cátodo (-). El proceso se realizó en las condiciones siguientes: 20 V 25 mA 1 W 15°C 5 Vh. Se comprobó la transferencia cortando una tira del papel de nitrocelulosa y tiñéndolo con Amido Black. A continuación se procedió a la detección con los sueros mediante el siguiente procedimiento.

3.9.2.1. Reactivos.

- Tampón fosfato salino (PBS) 0.15M: NaCl, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KCl, ph 7.4.
- Tampón de bloqueo; PBSTG: PBS con Tween 20 al 0,2 % y Gelatina al 0,4%.
- Tampón de incubación y lavado; PBST: PBS con tween al 0,1%
- Inmunoconjugados utilizados:

Anticuerpo anti-Ig humana marcado con peroxidasa, con especificidad frente a la cadena ligera (Boehringer Mannheim GmbH).

Anticuerpo anti-IgG humana (especificidad fragmento Fc) marcado con peroxidasa (Sigma Immuno Chemicals).

Anticuerpo anti-IgM humana (especificidad cadena μ) marcado con peroxidasa (Sigma Immuno Chemicals).

Anticuerpo anti-IgA humana (especificidad cadena α) marcado con peroxidasa (Sigma Immuno Chemicals).

Anticuerpo Monoclonal anti-IgE humana marcado con fosfatasa alcalina (Sigma Immuno Chemicals).

- Sustrato de peroxidasa: 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) produce un producto insoluble, es apropiado para utilizarlo como sustrato en las técnicas de inmunoblot, ELISA, etc. (Manual of Clinical Laboratory Immunology. Third Edition. Noel R. Rose. pag. 106). Preparar 0,1M Tris-HCl, pH 7,4 conteniendo 0,5 mg/ml 3,3'-Diaminobenzidina tetrahidrocloridrica y 1:5000 de H_2O_2 .

- Sustrato de la fosfatasa alcalina: Fast Red, produce un producto insoluble y coloreado, usado para los mismos fines que los sustratos de peroxidasa. Disolver 40 mg de Naftol As-Mx fosfato sódico (Sigma) en 100 ml de tampón 0,2M de Tris-HCl pH 8. Disolver 25 mg de fast red TR (sigma) en 5 ml de agua destilada. Mezclar las dos soluciones en igual volumen (1:1), filtra, y usar inmediatamente. El producto de la reacción es rojo.

3.9.2.2. Procedimiento.

Toda la manipulación se realiza con guantes.



1. Todas las tiras se incuban con la solución de bloqueo durante 3 horas en agitación a temperatura ambiente.

2. Después de efectuar varios lavados, se incuban unas tiras con sueros individuales de pacientes con hidatidosis y otras con sueros de otras parasitosis y sueros de donantes sanos (controles negativos), a la dilución de 1:50 en PBST durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente.

3. se lavan tres veces por 5 min con PBST.

4. incubar con el inmunoconjugado, a la dilución 1:800, durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente.

5. lavar como en 3.

6. incubar con el sustrato adecuado durante 15 a 30 min a 37°C, tras los cuales se extraen las tiras de papel de la mezcla de incubación se lavan con agua y se secan.

3.9.2.3. Determinación de los pesos moleculares.

La movilidad de las proteínas durante la electroforesis está en función de los logaritmos de sus pesos moleculares.

Un patrón de pesos moleculares se introdujo en cada desarrollo electroforético; de igual forma se transfirió a la nitrocelulosa donde se determinó la distancia relativa recorrida por cada proteína (Rf), este valor se representó frente al logaritmo del peso molecular de las proteínas patrón, obteniéndose de esta forma una recta patrón. A continuación se midió la distancia relativa recorrida para cada banda proteica del antígeno, pudiendo determinar el peso molecular tomando como referencia la recta patrón.

3.9.3. Dot-ELISA.

El Dot-ELISA consiste en fijar el antígeno a una membrana, que puede ser de Nitrocelulosa, Nylon o Inmobilon (PVDF) y una vez bloqueados los sitios libres de la membrana (por lo general con el detergente Tween 20), se incuba ésta con el

suero de pacientes en una dilución adecuada, al objeto que se unan los anticuerpos presentes en el suero al antígeno. Para comprobar si se han unido o no los anticuerpos al antígeno, se hace reaccionar la membrana con anticuerpos anti-humano marcados con peroxidasa. La presencia de la enzima es identificada mediante algún ensayo enzimático que produzca algún precipitado coloreado sobre la membrana.

Como antígeno, se ha utilizado la fracción enriquecida por el antígeno 5 y B purificada según Oriol y col. (1971). Para realizar esta técnica hemos seguido el método descrito por Rogan M.T. y col.(1991).

3.9.3.1. Reactivos.

- Membrana de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell).
- Tampón fosfato salino (PBS) 0.15M: NaCl, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KCl, ph 7.4.
- Tampón de bloqueo, PBST: PBS con Tween 20 al 0.3%.
- Tampón de lavado y diluyente: PBS con Tween 20 al 0.1%.
- Inmunoconjugado utilizado: Anticuerpo anti-IgG humana (Fc específica) marcado con peroxidasa (Sigma Immuno Chemicals).
- Sustrato de peroxidasa: 30mg de 4-cloro-1-naftol diluidos en 10ml de metanol. De éstos se diluyen 2ml en 10ml de tampón de trietanolamina de pH 7.5 (7.5g de NaCl, 2.8ml de trietanolamina, 17 ml de HCl 1M, 0.1g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.02g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, llevar hasta 1l con agua destilada), y se añaden 5 μ l de peróxido de hidrógeno al 30%. Este reactivo debe ser preparado y usado inmediatamente (Manual of Clinical Laboratory Immunology. Third Edition. Noel R. Rose. pag. 106).

3.9.3.2. Procedimiento.

- 1- Se equilibra la membrana de nitrocelulosa en PBS.
- 2- Se diluye el antígeno dando una concentración de 1 μ g/ μ l en PBS, y se depositan 2 μ l sobre cada tira de papel de nitrocelulosa en forma de banda a través

el ancho de la misma, y perpendicularmente a lo largo de la tira se depositan 2 μ l de peroxidasa (10 μ g/ml) como control de la técnica.

3- Se dejan secar 30min, tras los cuales se procede al bloqueo con PBST durante 1 hora.

4- Se lavan las tiras 3 veces.

5- Unas tiras se incuban con 6 "pools" de sueros de hidatidosis, otras con sueros de cisticercosis y de donantes sanos (controles negativos), a la dilución 1:100 durante 15 min a temperatura ambiente.

6- Se lava como en 4.

7- Las tiras se incuban con el inmunoconjugado diluido 1:800, durante 15 min a temp. ambiente.

8- Lavar como en 4.

9- Incubar con el la solución de sustrato durante 10 min, tras los cuales se extraen las tiras de papel de la mezcla de incubación, se lavan con agua y se secan.

3.9.4. Criterio de positividad y análisis estadístico.

- Criterio de positividad.

En ELISA los resultados se intepretaron en base a un criterio universalmente escogido: La media de los valores de la absorbancia obtenidos con los sueros controles (donantes sanos) mas tres veces su desviación estandard.

- Análisis estadístico.

Con todos los resultados definitivos se procedió a realizar el estudio sobre la eficiencia de la técnica utilizando dichas fracciones antigénicas, con lo que se calcularon los valores de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) según las fórmulas que se adjuntan:

- Sensibilidad : Indica la frecuencia de un resultado positivo en pacientes con una enfermedad particular; se puede expresar como el porcentaje de positividad en presencia de una enfermedad. Capacidad para detectar una muestra positiva.

$$S = \frac{P}{P+FN} \times 100$$

- Especificidad : Indica la frecuencia de resultados negativos en pacientes sin enfermedad; es el porcentaje de negatividad en pacientes sin la enfermedad estudiada. Capacidad de la técnica para discriminar entre una muestra positiva y otra negativa.

$$E = \frac{VN}{VN+FP} \times 100$$

- Valor predictivo positivo : Es una medida del porcentaje de pacientes enfermos entre todos los pacientes con resultados positivos en el test.

$$VPP = \frac{P}{P+FP} \times 100$$

- Valor predictivo negativo : Porcentaje de pacientes sin enfermedad entre todos los que tiene resultado negativo en el test.

$$VPN = \frac{VN}{VN+FN} \times 100$$

- Eficiencia : Porcentaje de pacientes correctamente clasificados por el test.

$$Ef = \frac{P+VN}{P+FP+FN+VN} \times 100$$

P resultados positivos.

VN..... „ negativos.

FP..... „ falsos positivos.

FN..... „ falsos negativos.

3.9.5. Ensayo inmuno-oro (gold inmunoassay).

3.9.5.1. Oro coloidal

Fué introducido por Faulk y Taylor en 1971 y es un excelente trazador

inmunocitoquímico para M.E. las partículas de oro coloidal se obtienen por reducción química del cloruro de oro en solución (ácido cloroáurico); por variaciones en el método de reducción se pueden obtener partículas homogéneas de diversos tamaños (entre 5 y 40 nm). Las partículas de oro obtenidas forman un coloide inestable que tiene gran capacidad para adsorber proteínas en su superficie que estabilizan la solución coloidal. La adsorción de proteínas por parte del oro coloidal esta influenciada por diversos factores como el tamaño de las partículas, la concentración de iones (que debe mantenerse lo más baja posible), el pH y la concentración de proteína. El pH es uno de los factores más importantes y debe ajustarse a un nivel ligeramente básico respecto al de la proteína que se desee acoplar. La solución de oro coloidal acoplada a la proteína (generalmente anticuerpos, lectina o proteína A), presenta cierta inestabilidad y tiene tendencia a producir agregados que entorpecen su uso inmunoquímico o histoquímico; por ello se recomienda adicionarla de agentes estabilizantes como el polietilenglicol de pm 20.000D o la seroalbúmina bovina altamente purificada. Además de ser un excelente trazador para microscopia electrónica de transmisión y de barrido (Harven y col., 1984), también en la presente memoria ha sido usado en analisis inmunoquímicos "immunogold assays".

- Preparación de oro coloidal de 10-20 nm (Knecht, E. y col. 1986).

1. Preparar 100 ml de una solución de ácido tetracloroáurico (Sigma) al 0,01%.
2. Calentar hasta ebullición esta solución, en un matraz Erlemeyer, agitando continuamente.
3. Añadir rápidamente 3-6 ml (el tamaño de la partícula sera menor cuanto mayor sea la cantidad añadida) de citrato trisódico al 1% en solución acuosa. La solución adquirirá un color azul que virará a rojo, tras unos cinco minutos, indicando el fin del proceso de reducción.
4. Enfriar la solución en un baño de agua-hielo
5. Ajustar el pH a 6.

Almacenar a 4°C.

3.9.5.2. Preparación del complejo proteína A-oro coloidal.

1. Calculo de la cantidad de proteína A (Sigma) necesaria para estabilizar el coloide mediante el ensayo siguiente:

	μl						
Tubo	1	2	3	4	5	6	7
Sol. oro coloidal	500	500	500	500	500	500	500
H ₂ O	-	10	20	30	40	45	50
Prot.A,0.2mg/ml	50	40	30	20	10	5	-
Agitar y esperar 5 min							
NaCl 10%	500	500	500	500	500	500	500
Agitar y esperar 10 min							
Color:	?	?	?	?	?	?	Azul
Tubo	1	2	3	4	5	6	7

La estabilidad del coloide se mantiene por repulsión electrostática entre las partículas AuCl₂ y la adición de electrolitos, como el NaCl, produce la floculación de las mismas en agregados. Esta floculación conlleva un cambio de color (de rojo a azul) que puede evitarse estabilizando el coloide por adsorción de sustancias hidrofóbicas, como proteínas, al oro coloidal. Un cambio de color en la solución de oro coloidal de rojo a azul indica la existencia de floculación. Si no se produce en los primeros seis tubos (hay un exceso de proteína A), se diluye diez veces más la solución de proteína A. Por el contrario, si todos los tubos viran al color azul, debe usarse una solución diez veces más concentrada. Para determinar el cambio de color en caso de no fuera visible a simple vista, se puede leer la absorción a 520 nm en un espectrofotómetro; la floculación produce un descenso en ese valor y un incremento en la absorción a las longitudes de ondas más largas.

2. Se calcula la cantidad de proteína A necesaria a partir de la cantidad menor que estabiliza al oro coloidal en el ensayo descrito (tubo anterior al primer tubo que da color azul, excluyendo, lógicamente, el número 7) e incrementarla en un 10% para compensar pequeños errores y garantizar así la total estabilización del complejo.

3. Se toma 1 ml de solución de oro coloidal en un tubo de ensayo y se añade la cantidad de proteína A calculada. Esperar 5 min a 20 °C.

4. Se añade 100 µl de solución al 1% de polietilenglicol 20.000, se agita durante 2 min, verificando que si se ha producido la estabilización del oro coloidal mediante el ensayo descrito en 1.

5. Se centrifuga la preparación a 19.000 rpm durante una hora a 4°C. La centrifugación produce un precipitado del complejo de proteína A-oro coloidal en el fondo del tubo, de color rojo, y otro precipitado más oscuro adherido a la pared del tubo que corresponde a agregados de partículas de oro no estabilizadas.

6. Se elimina con cuidado el sobrenadante claro, que contiene proteína A libre, y se resuspende el concentrado del fondo del tubo en PBS, 0,15 M a pH 7,4, conteniendo 0,2 mg/ml de polietilenglicol 20.000, 20% de glicerol como estabilizante y 0.05% de azida sódica como preservante, en un volumen correspondiente a 25 veces concentrado respecto al volumen inicial de la solución del oro coloidal. El inmunoconjugado se almacena a 4°C hasta su utilización (la preparación es estable durante varios meses).

3.9.5.3. Reactivos.

- Membrana de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell).
- Tampón fosfato salino (PBS) 0.15M: NaCl, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KCl, pH 7.4.
- Tampón de bloqueo: PBS con 0.3% de Tween 20 y 1% de gelatina.
- Tampón de lavado y diluyente: PBS con 0.1% de Tween 20.
- Inmunoconjugado: El complejo proteína A-oro coloidal, preparado como se describe en el apartado anterior.

* Antígeno utilizado:

- Antígeno B y 5 purificado según el método descrito en el apartado.....
- Antígeno B y 5 desprovisto de contaminantes de alto peso molecular.

3.9.5.4. Procedimiento.

Se estandarizó este proceso, después de realizar varios ensayos, al fin de obtener una sensibilidad e especificidad semejantes a los que tienen las técnicas convencionales.

1- Se cortan las tiras de nitrocelulosa a un tamaño adecuado.

2- Se prepara el antígeno a una concentración 1.5-2 μ g/ μ l en PBS y se depositan en forma de banda a través el ancho (6mm) de la tira previamente equilibrada y secada.

3- Se dejan secar durante 30 min, tras los cuales se procede al bloqueo durante 1 hora y 30 min a temperatura ambiente.

4- Después de varios lavados, las membranas sensibilizadas se pueden conservar secas durante varias semanas a 4°C.

A partir de este momento podemos proceder a la inmunodetección con una duración aproximadamente de 25 min.

5- Las tiras se incuban con los sueros a la dilución de 1:75 durante 10 min.

6- lavar

7- Hacia uno de los extremos de la tira se deposita el inmunoconjugado, después se hace desplazar las partículas por capilaridad.

Cuando el frente de migración alcanza el otro extremo, la reacción ha terminado. este paso dura aproximadamente 10 min.

En el caso de resultado positivo, justo en la banda donde hemos depositado el antígeno, aparece una banda de color rosa-rojizo. Y en el caso de negativo no aparece ningún color.

(modelo patentado por los autores a través de la Universidad de Granada).

3.9.6. Aglutinación de látex.

Se utilizó un Kit comercial (LBTEX HIDATIDOSIS, TEX) fabricado con tecnología y supervisión de la Cátedra de Inmunología (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 por aglutinación de partículas de látex.

LBTEX-HIDATIDOSIS: utiliza fracciones antigénicas del parásito de alto valor diagnóstico obtenidas por un nuevo método desarrollado en la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Química para su purificación a partir de líquido hidatídico fértil.

3.9.6.1. Fundamento.

El reactivo látex LBTEX-HIDATIDOSIS es una suspensión de partículas de poliestireno de diámetro 0,3 μm sobre las cuales se ha adsorbido antígeno hidatídico purificado.

La suspensión de partículas de poliestireno tiene un aspecto uniforme, lechoso, si se le observa a simple vista expandida sobre un porta. Si esta suspensión se enfrenta a una muestra en la cual hay anticuerpos desarrollados contra el parásito, esta suspensión pierde su aspecto uniforme produciéndose una agregación de las partículas, esta agregación puede observarse a simple vista. Estos agregados están formados por el entrecruzamiento de las partículas de látex por los anticuerpos presentes en la muestra al unirse estos al antígeno adsorbido sobre las partículas de látex.

3.9.6.2. Reactivos y controles.

El equipo LBTEX-HIDATIDOSIS consta además del reactivo látex, de dos controles (positivo y negativo), de manera que el analista puede disponer de un control del buen funcionamiento del reactivo.

- 1) Reactivo de látex.

Suspensión de partículas de látex de poliestireno en tampón glicina pH 8,2 sensibilizada con el antígeno. Contiene como preservativo, azida sódica a 1 mg/mL.

2) Control positivo.

Suero humano proveniente de hidatidosis confirmada más gamaglobulinas de conejo hiperinmunizado con antígeno hidático. la mezcla está diluida en tampón glicina para que con el lote de látex correspondiente al equipo dé un título entre 1/4 - 1/16. Contiene como preservativo, azida sódica a 1 mg/mL.

3) Control negativo.

Tampón glicina pH 8,2, albúmina bovina a 1 mg/mL. contiene como preservante, azida sódica.

3.9.6.3. Procedimiento.

- Antes de comenzar las determinaciones, dejar que el reactivo y los controles alcancen la temperatura ambiente (20-30°C).
- Agitar suavemente el reactivo látex. Evitar una agitación violenta, especialmente la formación de espuma.
- Depositar una gota de la muestra mediante el dispensador (aproximadamente 50 µL) en una de las secciones de la tarjeta.
- Añadir una gota del reactivo látex.
- Mezclar ambas gotas con el extremo romo del dispensador.
- La reacción debe de realizarse agitando la tarjeta con un movimiento suave de rotación durante 5 minutos. Esta agitación se podrá realizar manualmente o con un agitador orbital (60-80 rpm).
- observar bajo luz directa e intensa, la presencia o ausencia de aglutinación.

3.9.6.4. Interpretación de resultados.

Un aspecto comparable al del control negativo indica la ausencia de anticuerpos contra proteínas del parásito o niveles inferiores a la sensibilidad del reactivo. También se ha indicado la posibilidad de que la alta frecuencia de falsos

negativos en la técnica usadas en hidatidosis se debe a la formación de inmunocomplejos con exceso de antígeno (Craig, P.S. 1986).

Una aglutinación clara indica la presencia de anticuerpos, indicando posible hidatidosis.

- Calificación de las reacciones de aglutinación.

Reacciones positivas

- +++ Agregados grandes sobre fondo transparente.
- ++ Agregados medianos sobre fondo ligeramente turbio
- + Agregados pequeños sobre fondo turbio

Reacciones negativas

Aspecto uniforme, lechoso, ausencia de aglutinación.

- Limitaciones de la Técnica.

La técnica está ajustada ante el suero internacional de referencia de la Organización Mundial de la Salud (suero antiequinocócico humano).

Está descrito que los falsos negativos que generalmente pueden aparecer en las técnicas para detección de anticuerpos en hidatidosis son debidos a un exceso de antígeno circulante que neutraliza los anticuerpos, formando inmunocomplejos en exceso de antígeno.

RESULTADOS

4.1. Estudio mediante cromatografía de afinidad y SDS-PAGE de los diferentes antígenos del metacestode *E. granulosus* reconocidos por las inmunoglobulinas A, E y M del huésped.

Las inmunoglobulinas (A,E,M), de suero de pacientes con hidatidosis quirúrgicamente confirmada, aisladas y separadas por cromatografía de afinidad (figura 3.1 de material y métodos), reconocen 8 antígenos, en el líquido hidatídico, con distintos pesos moleculares. No obstante estas reacciones dependen de la clase de inmunoglobulina. La IgA, IgE e IgM reconocen bandas comunes de 42, 55 y 64-66 kDa. Las bandas correspondientes a 34-37 y 114 kDa fueron únicamente detectados por IgM, las de 68 y 110 por IgA, mientras la banda de 80 kDa ha sido detectada por IgM e IgE (figura 4.1, tabla 4.1). La fracción proteica del líquido hidatídico aportó poca reactividad dando bandas de 64-66 y 55 kDa (figura 4.1).

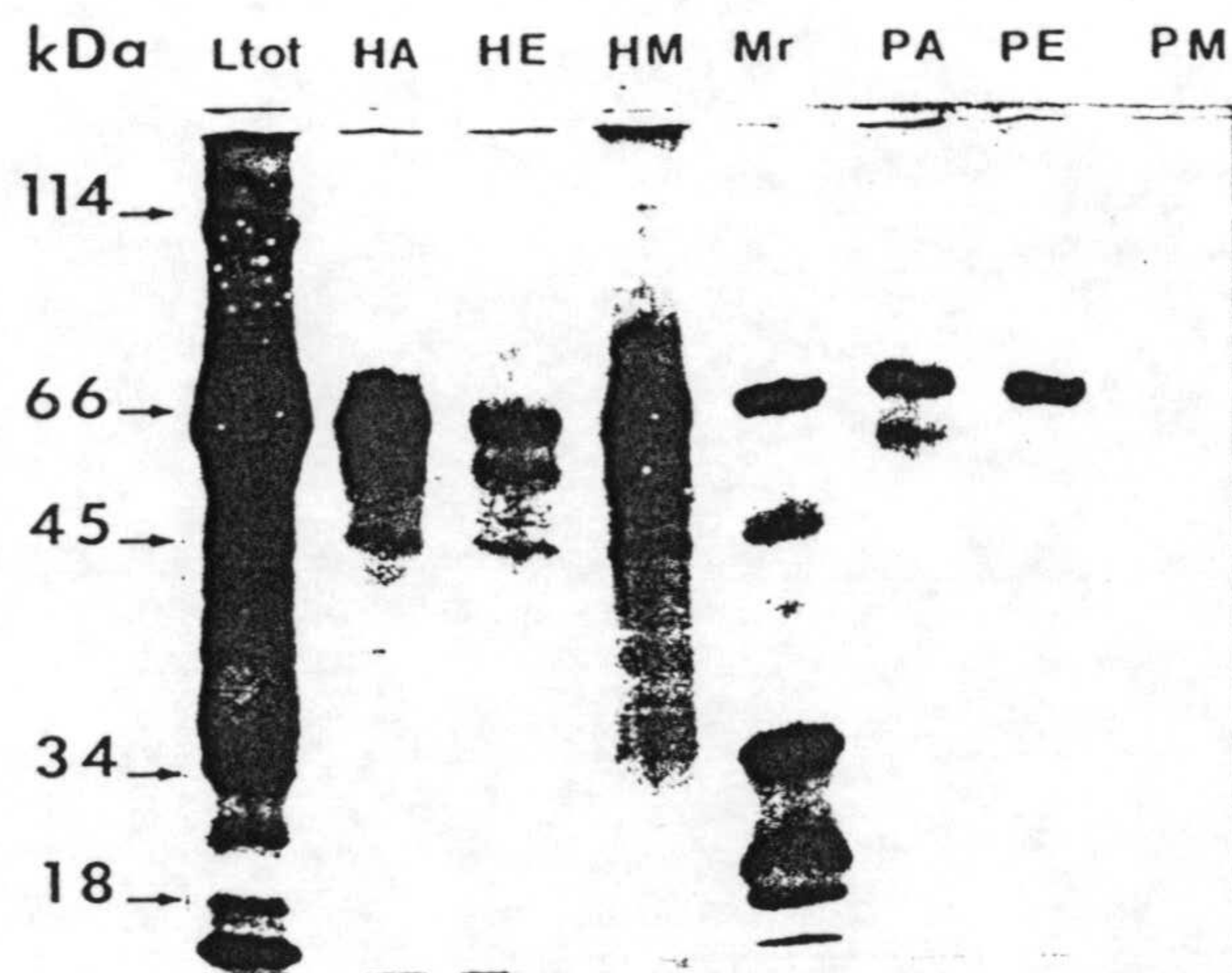


Fig.4.1. SDS-PAGE de las fracciones antigénicas del líquido hidatídico total (Ltot) purificadas por IgA (HA), IgE (HE) e IgM (HM) de pacientes. Antígenos de la fracción proteica aislados y purificados por IgA (PA), IgE (PE) e IgM (PM).

Tabla 4.1: Las bandas comunes y diferencialmente reconocidas por IgM, IgE y IgA en el líquido hidatídico.

Las bandas reconocidas (kDa)	IgM	IgE	IgA
34-37	[+]	-	-
42	+	+	+
55	+	+	+
64-66	+	+	+
68	-	-	[+]
80	[+]	[+]	-
110	-	-	[+]
114	[+]	-	-

- No reconocido
 + Reconocido
 [+] Reconocido diferencialmente

Independientemente de la clase de Ig, los anticuerpos aislados de suero de pacientes reconocen, al incubarlos con los mismos sueros, una serie de sustancias de distinto peso molecular (figura 4.2, tabla 4.2). Para averiguar cuales de estas sustancias que puedan estar relacionadas con componentes del suero humano normal, hemos realizado un experimento control. Las tres clases de inmunoglobulinas, del suero de pacientes, purificadas y immobilizadas, han sido incubadas con 3 tipos de sueros de donantes sanos (ARh+, BRh+ y ORh-). En los tres tipos de sueros, han sido reconocidos componentes de 75, 66, 55-60 y 37 kDa (figura 4.3). La banda de 89-90 kDa, se detectó en el suero BRh+ por IgM, en ARh+ por IgA e IgE, y en ORh- por IgM, IgE e IgA. IgM reconoció algunas otras bandas en suero BRh+ de bajo peso molecular (figura 4.3).

Tabla 4.2:

Las bandas (kDa) reconocidas por las tres clases de Inmunoglobulinas (M,E,A)												
En suero de Pacientes	120	104	89	75	66	52	47	43	40	38	36	34
En suero de donantes sanos			90-89	75	66	60-55					37	

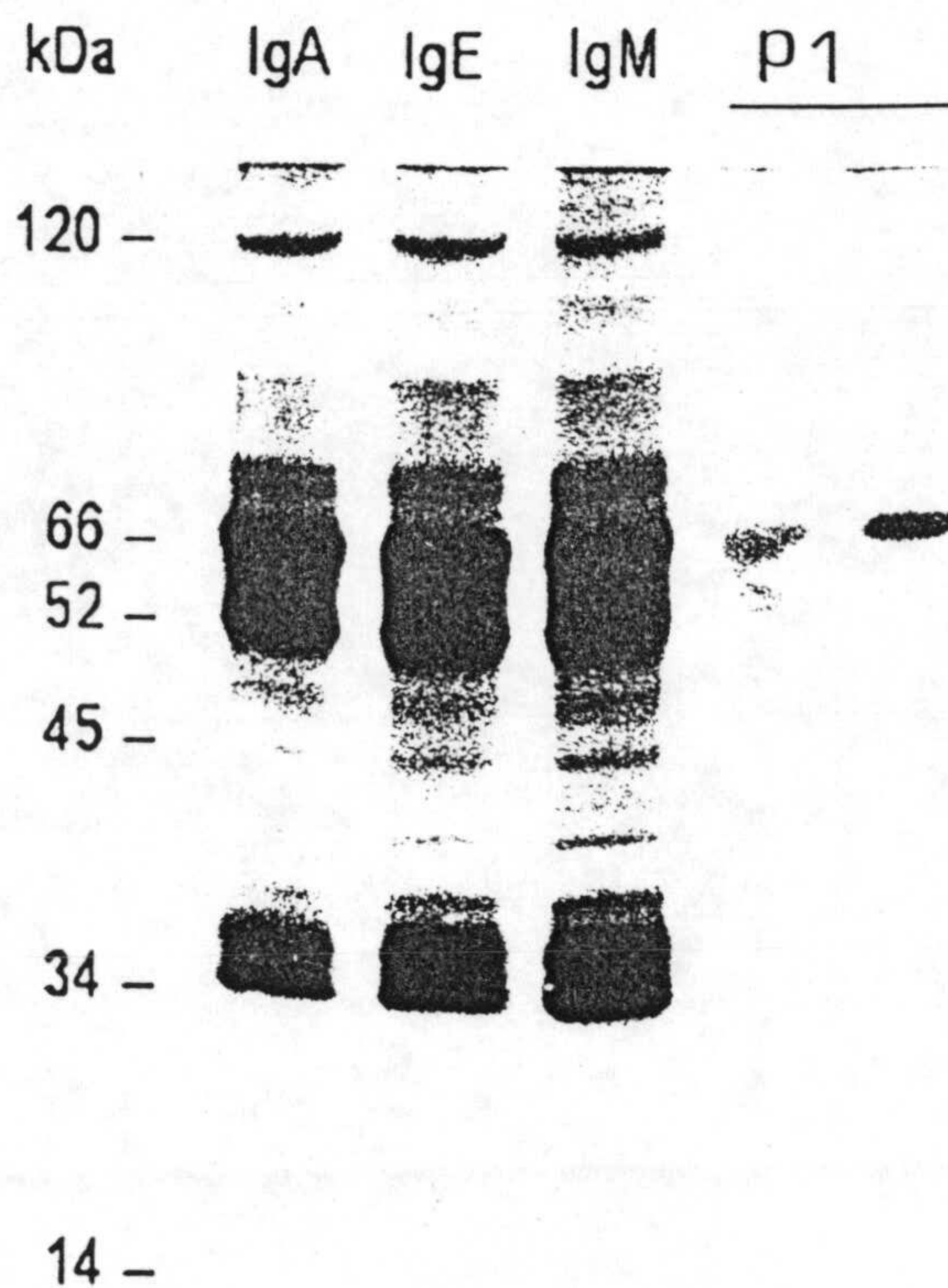


Fig.4.2. SDS-PAGE de las fracciones del suero de pacientes reconocidas por IgA, IgE e IgM de pacientes. P1 del líquido hidatídico purificado por cromatografía de afinidad en Sepharosa - Antic-P1.

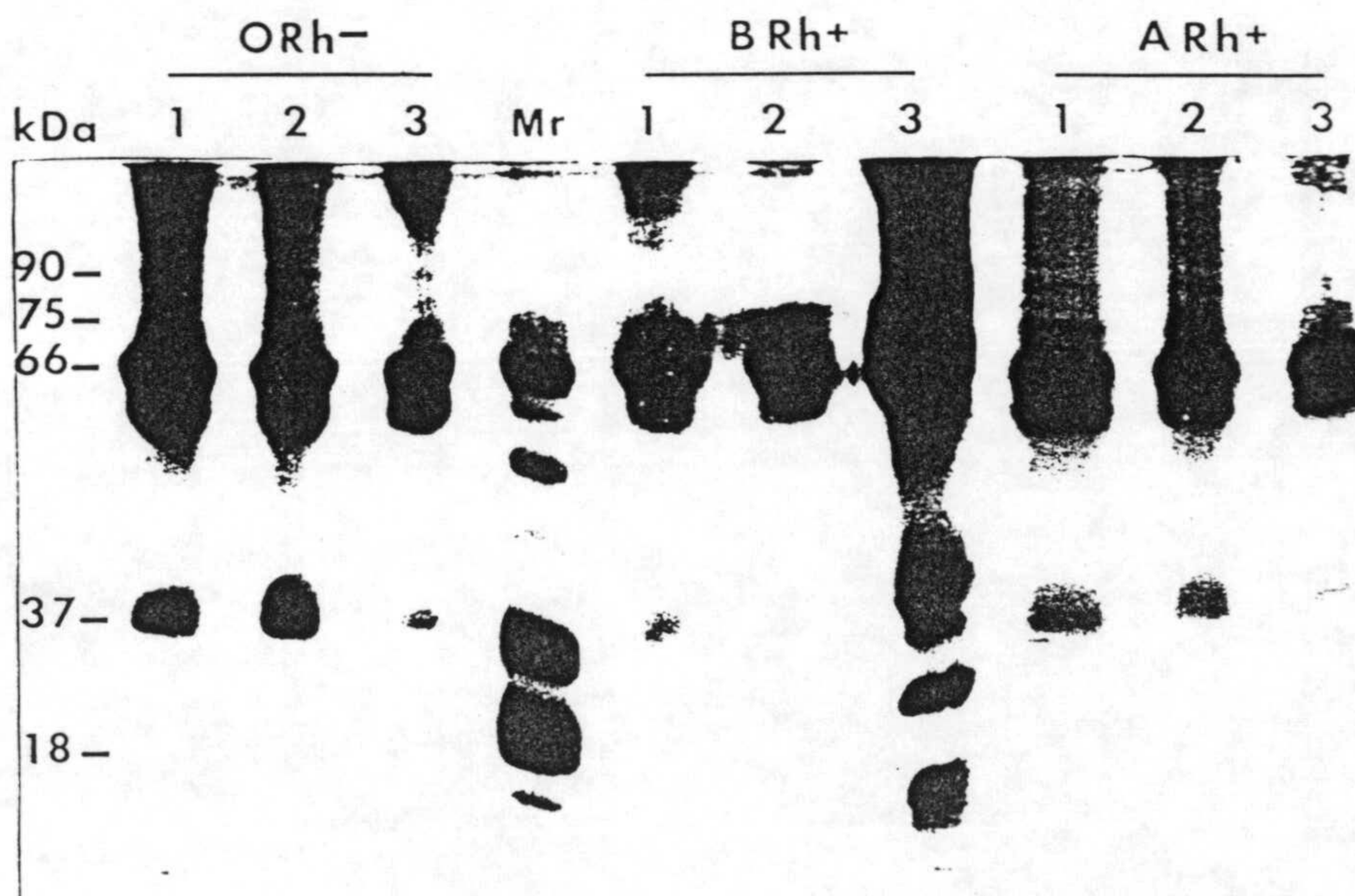


Fig.4.3. SDS-PAGE de las fracciones detectadas en el suero de donantes sanos (Grupo sanguíneo ORh-, BRh+ y ARh+) por IgA (1), IgE (2) e IgM (3) purificadas del suero de pacientes.

En la figura 4.4 se observa, que las inmunoglobulinas (A, E y M) de sueros de donantes sanos mediante inmunotransferencia de LH, no reconocen ningun antígeno excepto la IgM que se detectó frente a algunos componentes de alto peso molecular.

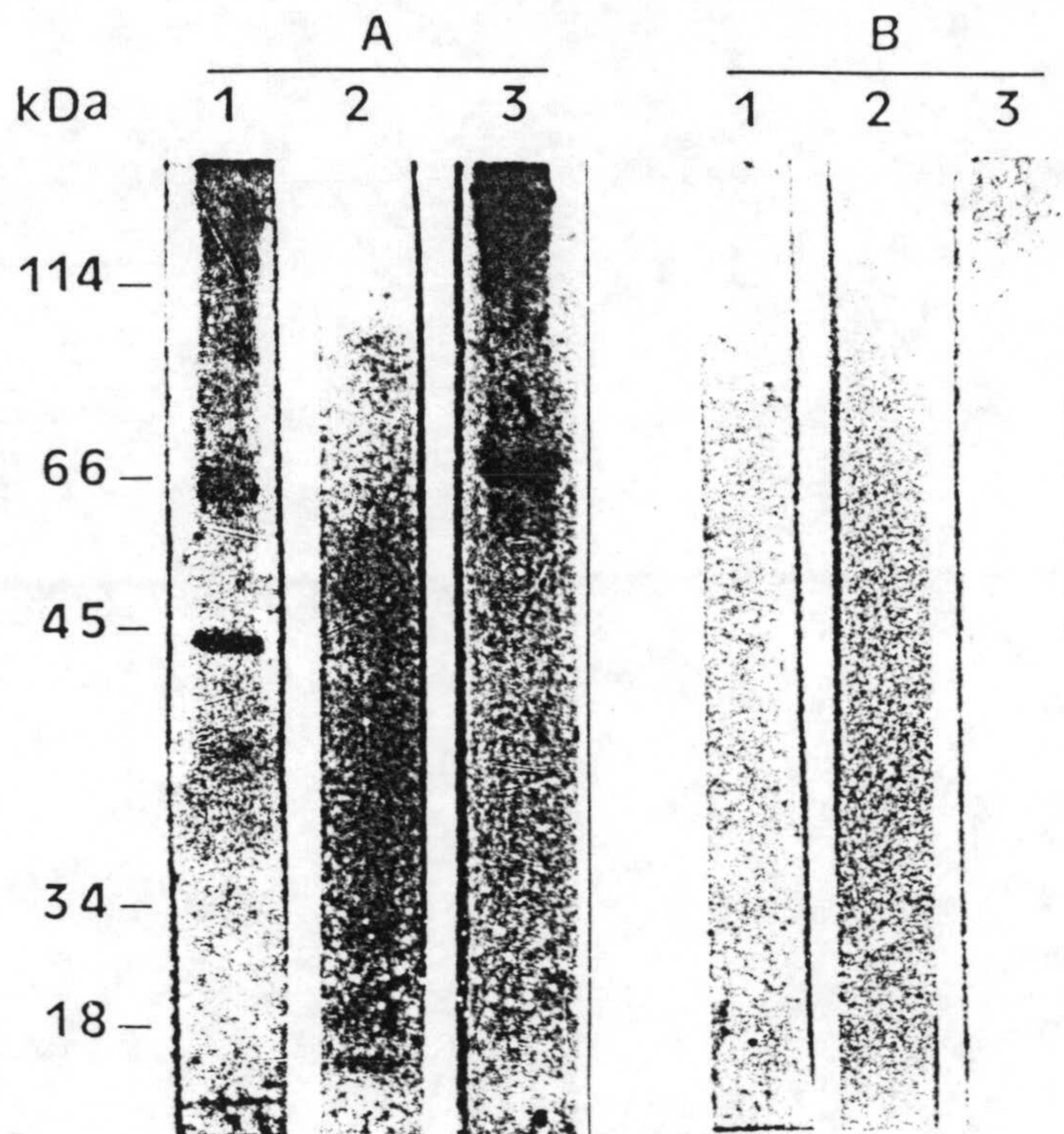


Fig.4.4. Inmunotransferencia de los antígenos del LH, con suero de pacientes con hidatidosis (A) y suero de donantes sanos (B). La detección de los anticuerpos se realizó con Anti-IgA (línea 1), Anti-IgE (línea 2) y Anti-IgM humana conjugados.

Igualmente, se observó la polireactividad inespecífica de las IgA, IgE e IgM de pacientes con hidatidosis cuando el líquido y extractos de cisticerco (*T. solium*) fueron incubados. Los resultados obtenidos se reflejan en la figura 4.5 y en la tabla 4.3.

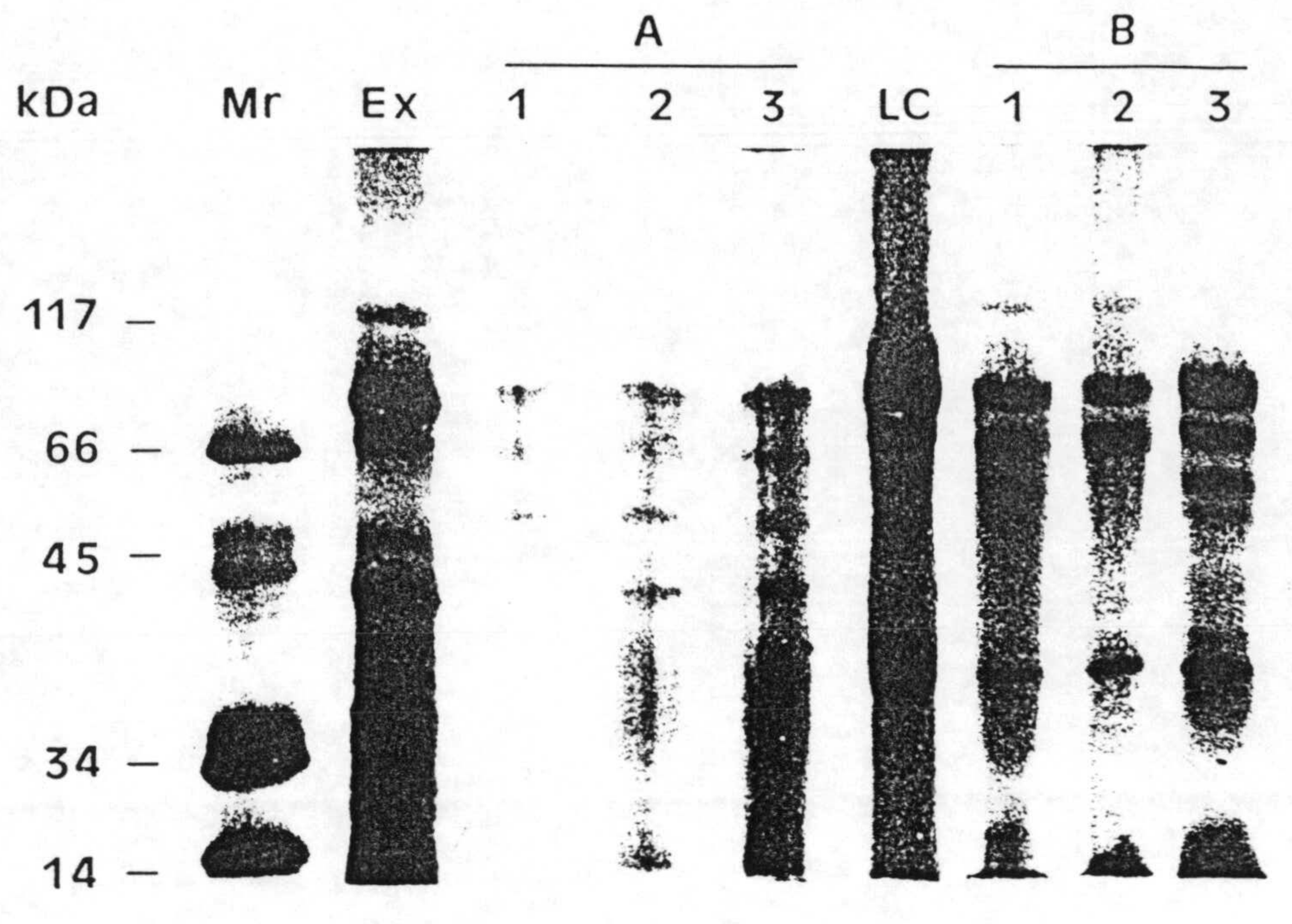


Fig.4.5. SDS-PAGE de las bandas reconocidas por IgA (línea 1), IgE (línea 2) e IgM (línea 3) en extractos (A) y líquido (B) de cisticerco.

Ex: Extractos de cisticerco; LC: Líquido de cisticerco; Mr: Proteínas marcadoras de peso molecular.

Tabla 4.3: Las bandas detectadas (kDa) por las Ig de pacientes con hidatidosis en el líquido y extractos de cisticerco.

Líquido de cisticerco			Extractos de cisticerco
IgA	IgE	IgM	reactividad comun IgA, IgE e IgM
117	117	-	86
86	86	86	66
66	66	66	54
58	-	58	40
36	36	36	34-37
14-16	14-16	14-16	

4.2

Las inmunoglobulinas del suero de pacientes con hidatidosis preicipitadas y separadas en dos fracciones (figura 3.2 de material y métodos), denominadas "suero específico" y "suero inespecífico" por cromatografía de afinidad. "El suero específico" reaccionó mayoritariamente con 9 antígenos de la fracción proteica del LH: 174, 75, 67, 55, 42, 38, 34, 22 y 16-12 kDa, sin embargo el "suero inespecífico" reconoció 3 bandas de 75, 67 y 12 kDa (figura 4.6).

En el líquido hidatídico, se obtuvieron resultados similares (figura 4.6). Independientemente de la fracción del suero utilizada, se detectaron unicamente 2 bandas de 75 y 67 kDa en el homogenado de los protoescólices (figura 4.6).

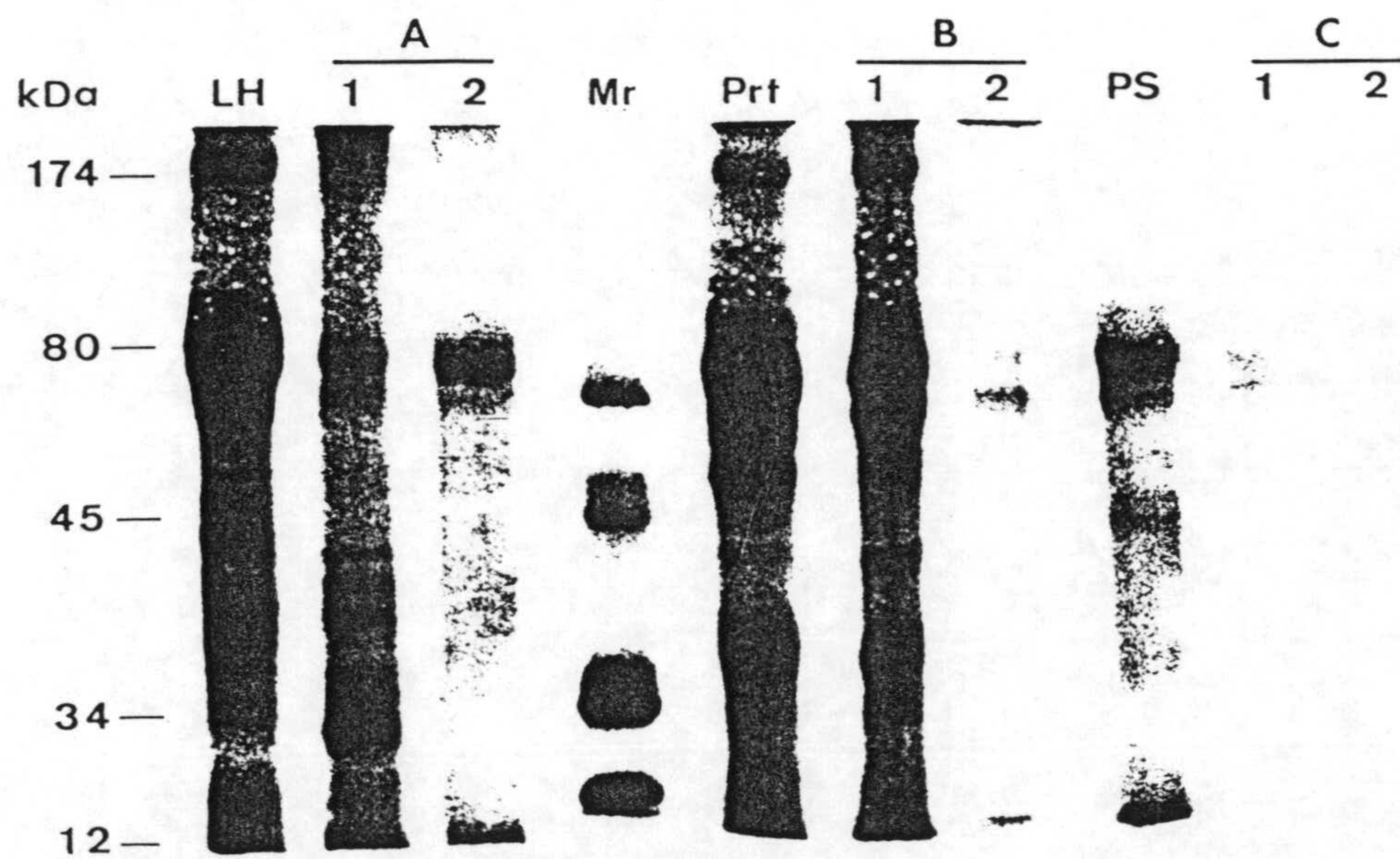


Fig.4.6. SDS-PAGE de los diferentes componentes antigénicos aislados del líquido hidatídico (LH) (A), de la fracción proteica (Prt) (B) y del homogenado de protoescólices (PS) (C) por el "suero específico" (línea 1) y el "suero inespecífico" (línea 2). Mr: Proteínas marcadoras de peso molecular.

4.3. Caracterización de los inmunocomplejos circulantes.

La presencia de inmunocomplejos circulantes (CIC) es un hallazgo frecuente en los pacientes con hidatidosis (Pini y col., 1983; Richard-lenoble y col., 1978), pero no guarda relación con la detección de anticuerpos específicos frente a *E. granulosus* (Craig y Nelson, 1984). Cualquier clase de inmunoglobulina puede formar parte del inmunocomplejo pero predomina la presencia de IgG.

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 (Craig, 1986; D'Amelio y col., 1989; Bonifacino y col., 1993).

4.3.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y semidesnaturalizantes de los inmunocomplejos circulantes.

Los inmunocomplejos precipitados según el procedimiento descrito en el apartado ... de material y métodos, se sometieron a separación en SDS-PAGE para estudiar posteriormente sus diferentes subunidades por inmunoblot.

Las subunidades mayoritarias presentan pesos moleculares de: 140, 97, 90, 75, 66, 38, 36 y 34 kDa (figura 4.7).

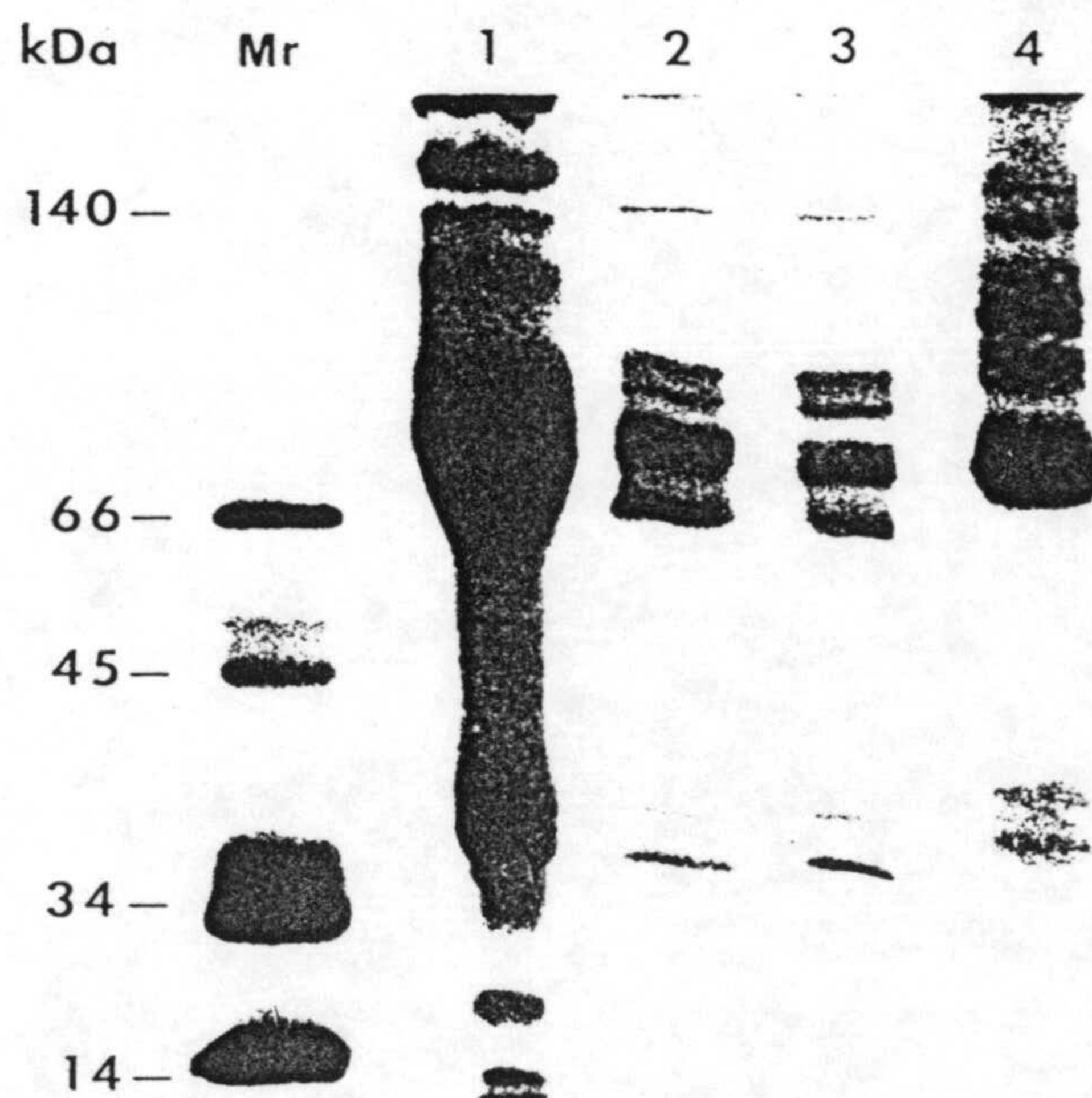


Fig.4.7. SDS-PAGE del inmunocomplejo en condiciones desnaturalizantes (línea 2 y 3) y semidesnaturalizantes (muestra sin hervir) (línea 4). Suero total (línea 1). Mr: Proteínas marcadoras de peso molecular.

4.3.2. Inmunotransferencia del CIC frente a las diferentes clases de inmunoglobulinas.

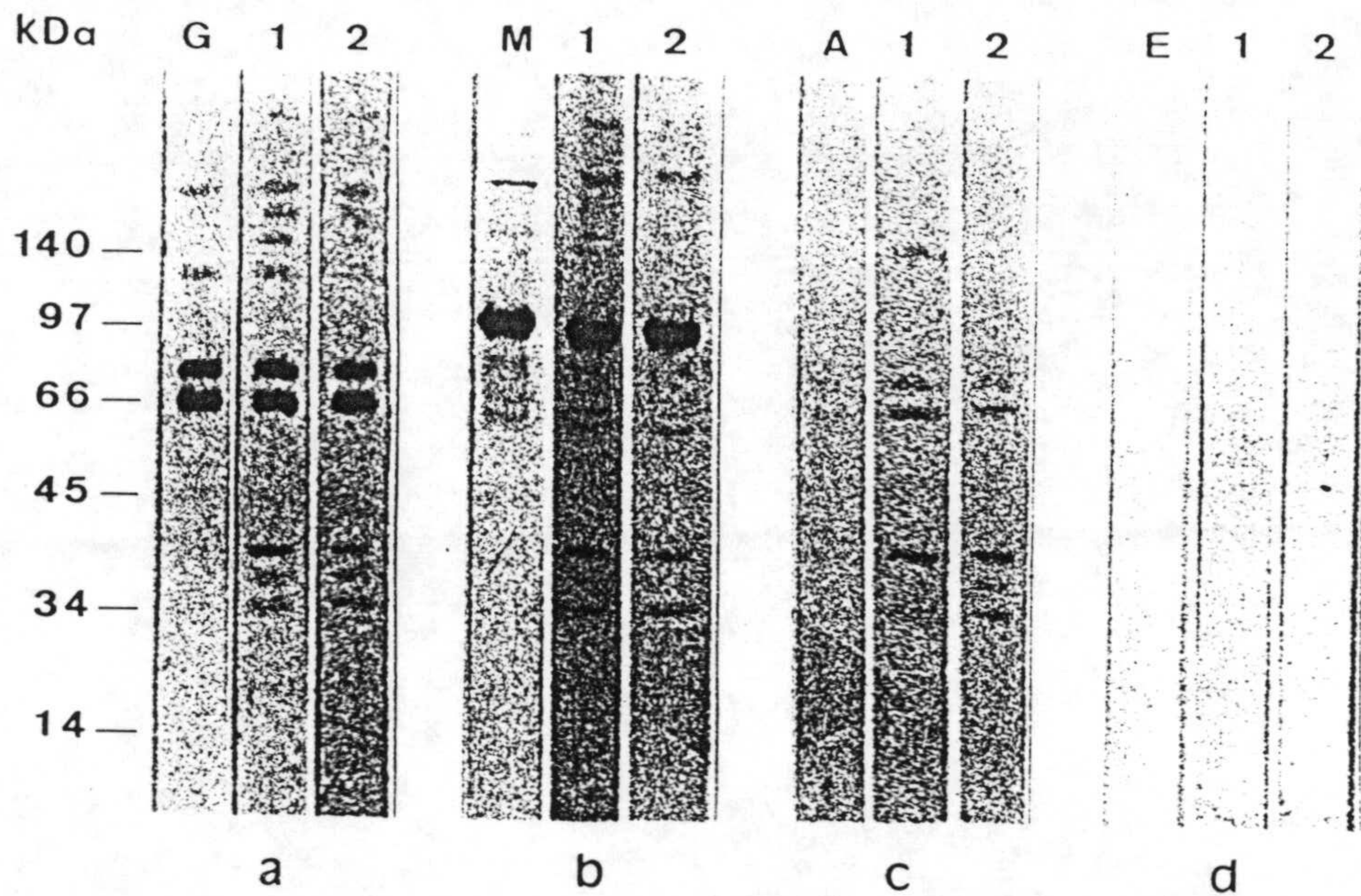


Fig.4.8. Inmunotransferencia de CIC frente a un pool de sueros de pacientes con hidatidosis (línea 1) y a un pool de sueros de donantes sanos (línea 2). La inmunodetección de los anticuerpos unidos se realizó con anticuerpos anti-IgG (a), anti-IgM (b), anti-IgA (c) y anti-IgE (d) humanas conjugadas. La línea G: tira incubada directamente con el Anti-IgG; la línea M con el Anti-IgM; la línea A con el Anti-IgA y la línea E con el Anti-IgE.

4.3.3. Inmunodetección de los componentes parasitarios anti-IgG del CIC.

Mediante la técnica de inmunotransferencia Western blot, hemos podido observar que existe un componente de 140 kDa que reacciona con los tres pools de sueros de pacientes con hidatidosis pero no con los tres pools de sueros de donantes sanos. Sin embargo presenta reacciones cruzadas con los sueros de pacientes con cisticercosis (figura 4.9).

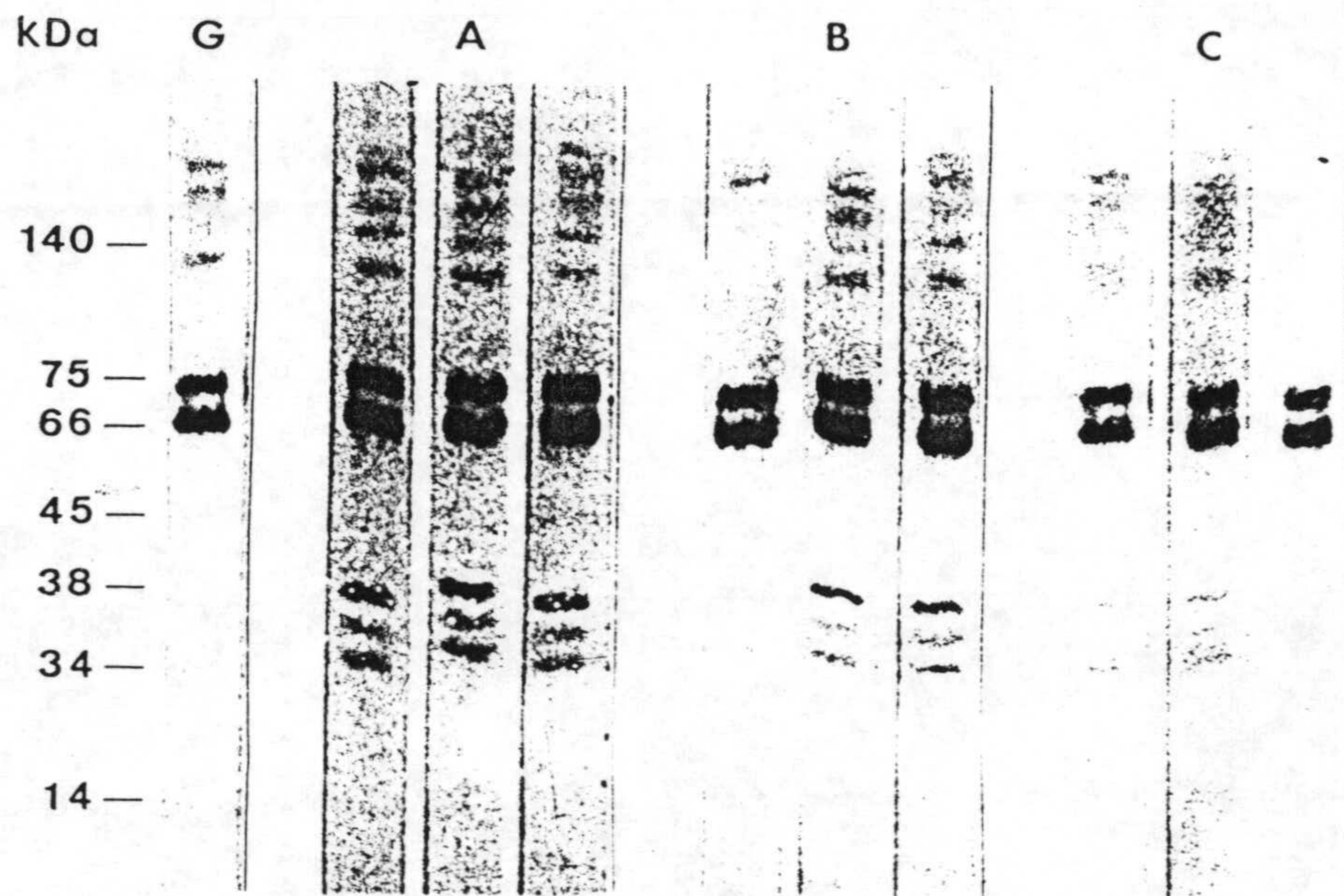


Fig.4.9. Inmunotransferencia de CIC frente a tres pools individuales de sueros de pacientes con hidatidosis (A), cisticercosis (B) y de donantes sanos (C). Posteriormente la inmunodetección se realizó con el conjugado de peroxidasa Anti-IgG humana. La tira (G) fué incubada directamente con el mismo conjugado.

4.3.4. Inmunodetección de los componentes parasitarios anti-Ig totales formando parte del inmunocomplejo circulante.

La subunidad de 162 kDa ha mostrado en este ensayo de tener relativamente origen parasitario, puesto que muestra una sensibilidad y especificidad considerablemente significativa (figura 4.10).

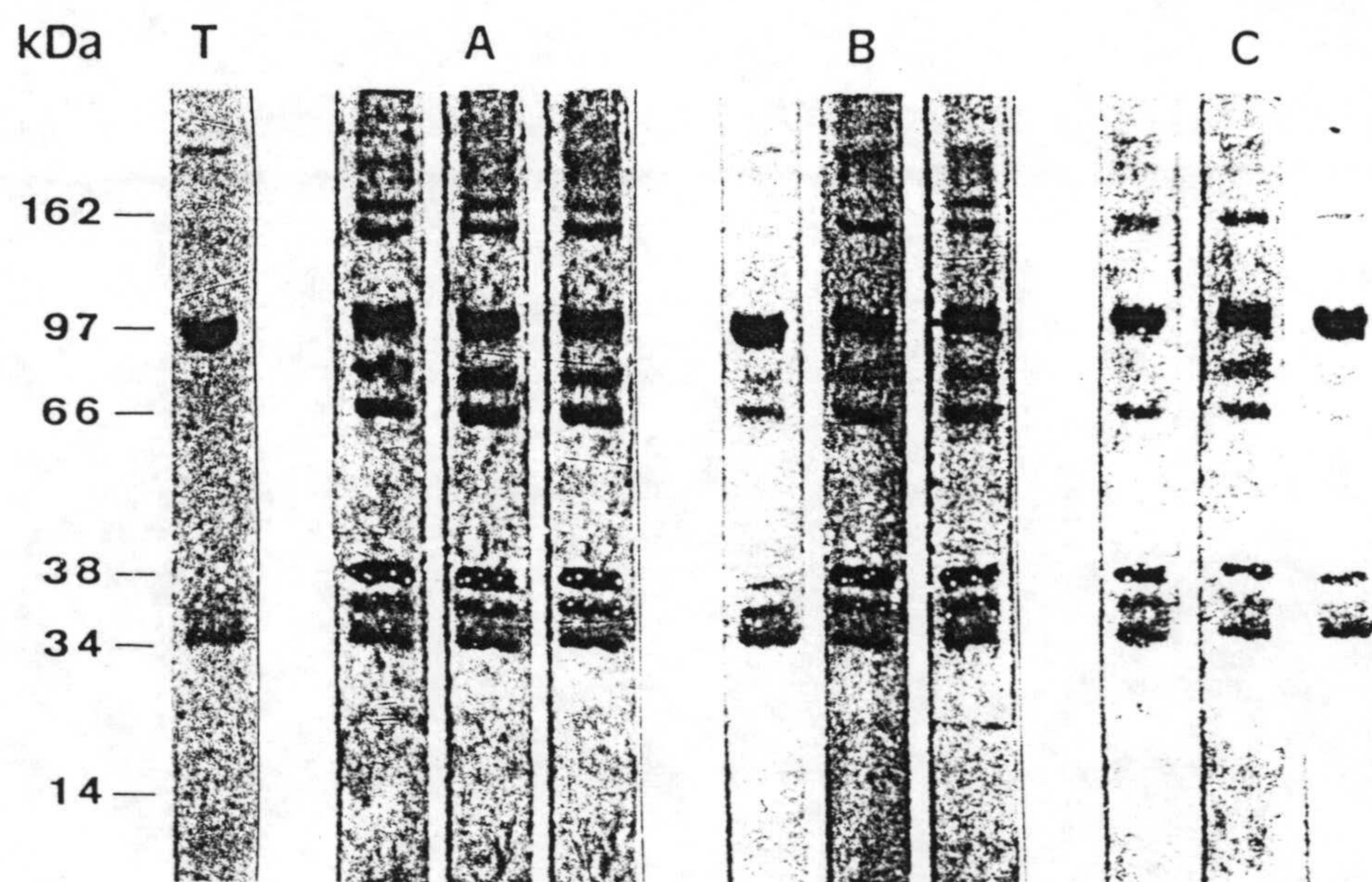


Fig.4.10. Inmunotransferencia de CIC frente a tres pools individuales de sueros de pacientes con hidatidosis (A), cisticercosis (B) y de donantes sanos (C). Posteriormente las tiras han sido expuestas para su revelado con el conjugado de peroxidasa Anti-Ig humanas y luego al diaminobencidina como sustrato. La tira (T) fué incubada directamente con el mismo conjugado.

4.3.5. Isoelectroforesis del inmunocomplejo circulante.

La separación en función de los puntos isoeléctricos de los componentes del CIC, ha mostrado que los inmunocomplejos están formados que presentan carácter básico y otras de carácter ligeramente ácido (figura 4.11).

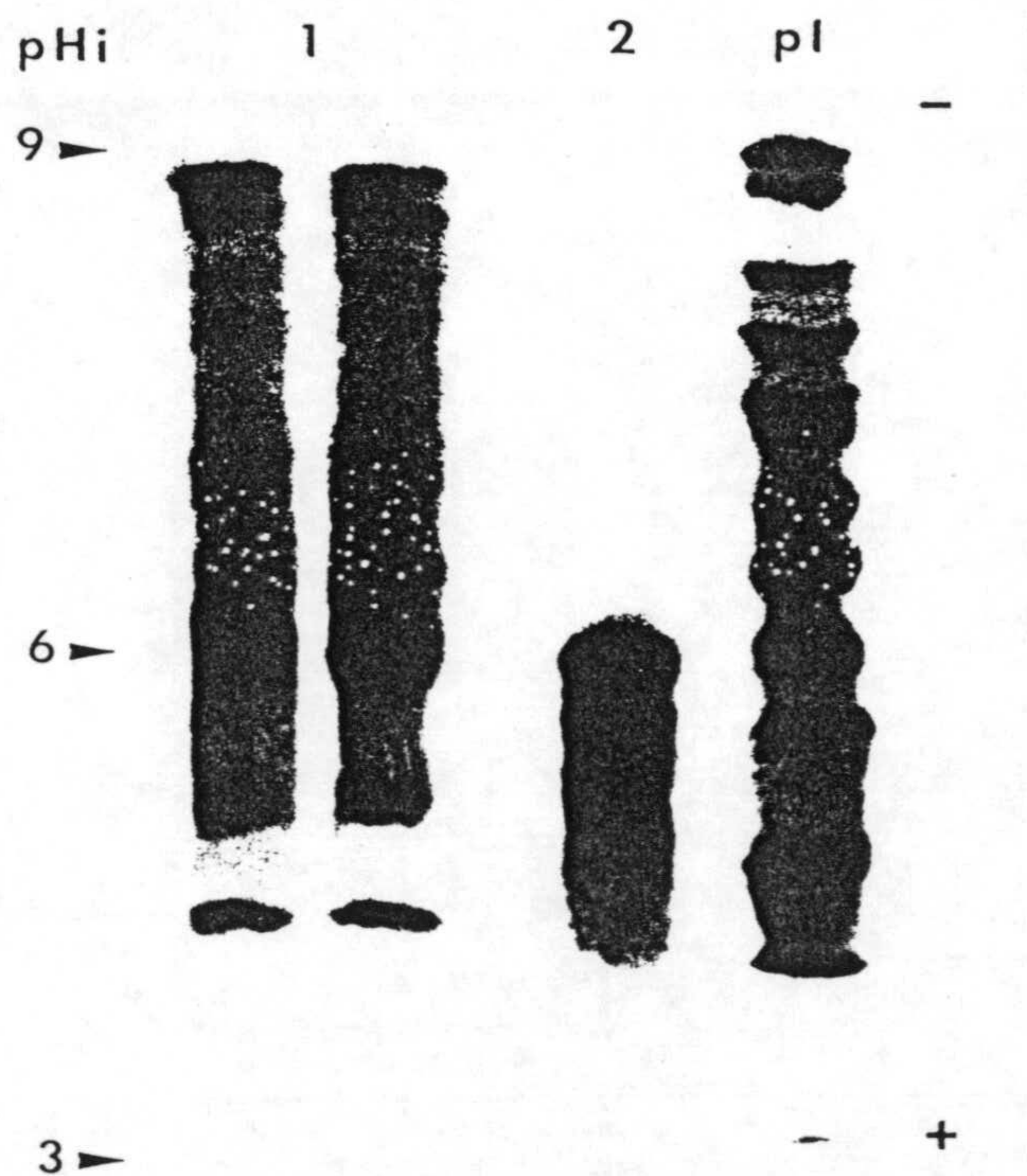


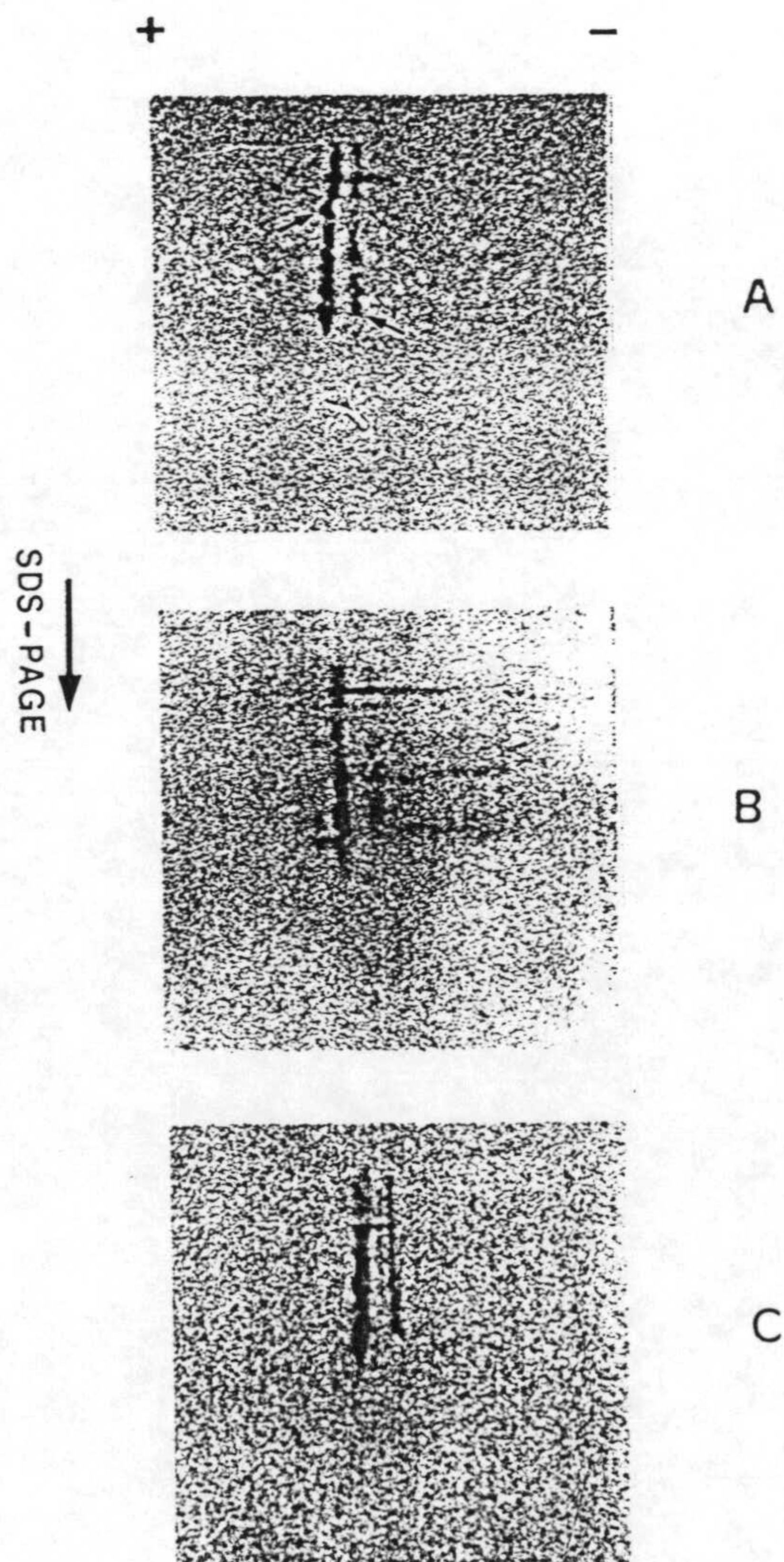
Fig.4.11. Isoelectroforesis en gel de poliacrilamida del CIC. 1: CIC en duplicado, 2: el complejo antígeno B y 5 semi purificado. pI: proteínas marcadoras de punto isoelectrico.

4.3.6. Detección de componentes anti-IgG en el CIC por inmunotransferencia tras una electroforesis bidimensional.

Se realizó la inmunotransferencia con papel de nitrocelulosa a la que han sido transferidos componentes del CIC separadas por electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida en condiciones semidesnaturalizantes (muestra sin hervir).

Como podemos deducir tras examinar los resultados obtenidos que refleja la figura 4.12, el componente de aproximadamente de 142 kDa con pI 6 y otro de 62 kDa con pI 6,8 no fueron reconocidos ni por los sueros de donantes sanos ni por el anti-IgG (directamente incubado), pero si detectados por el pool de sueros de pacientes con hidatidosis.

Fig.4.12. Ensayo de inmunolectrotransferencia tras una electroforesis bidimensional de CIC, enfrentado a un pool de sueros de pacientes con hidatidosis (A), a sueros de donantes sanos (B) y directamente expuesto a un conjugado de peroxidasa anti-IgG humana (C).



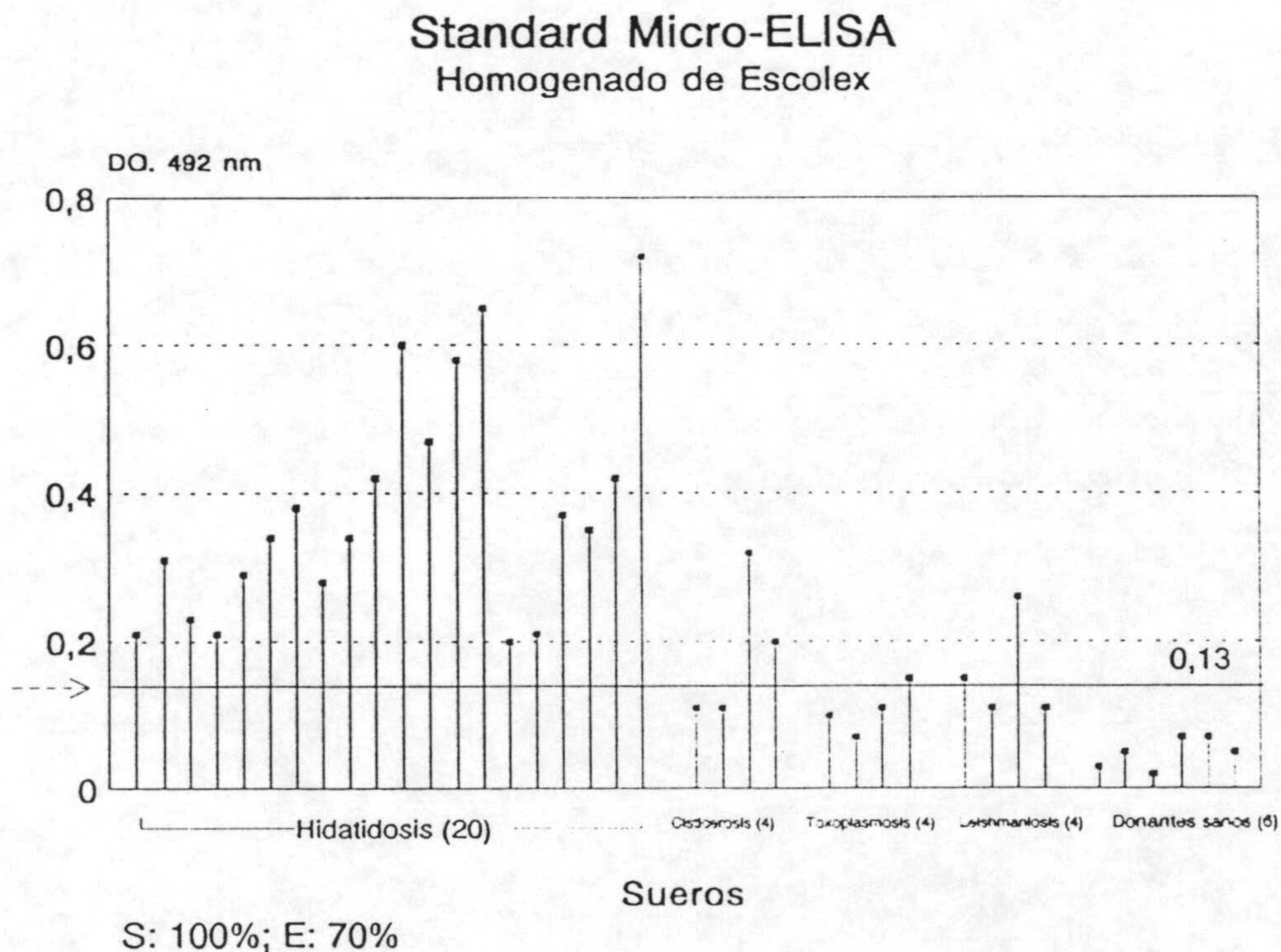
4.4. Resultados de las técnicas inmunológicas.

4.4.1. Detección de anticuerpos anti-*E. granulosus* por ELISA.

El valor de corte de la absorbancia así como la sensibilidad y la especificidad de cada preparación o fracción antigénica se representan en las gráficas 4.1a, b, c y d.

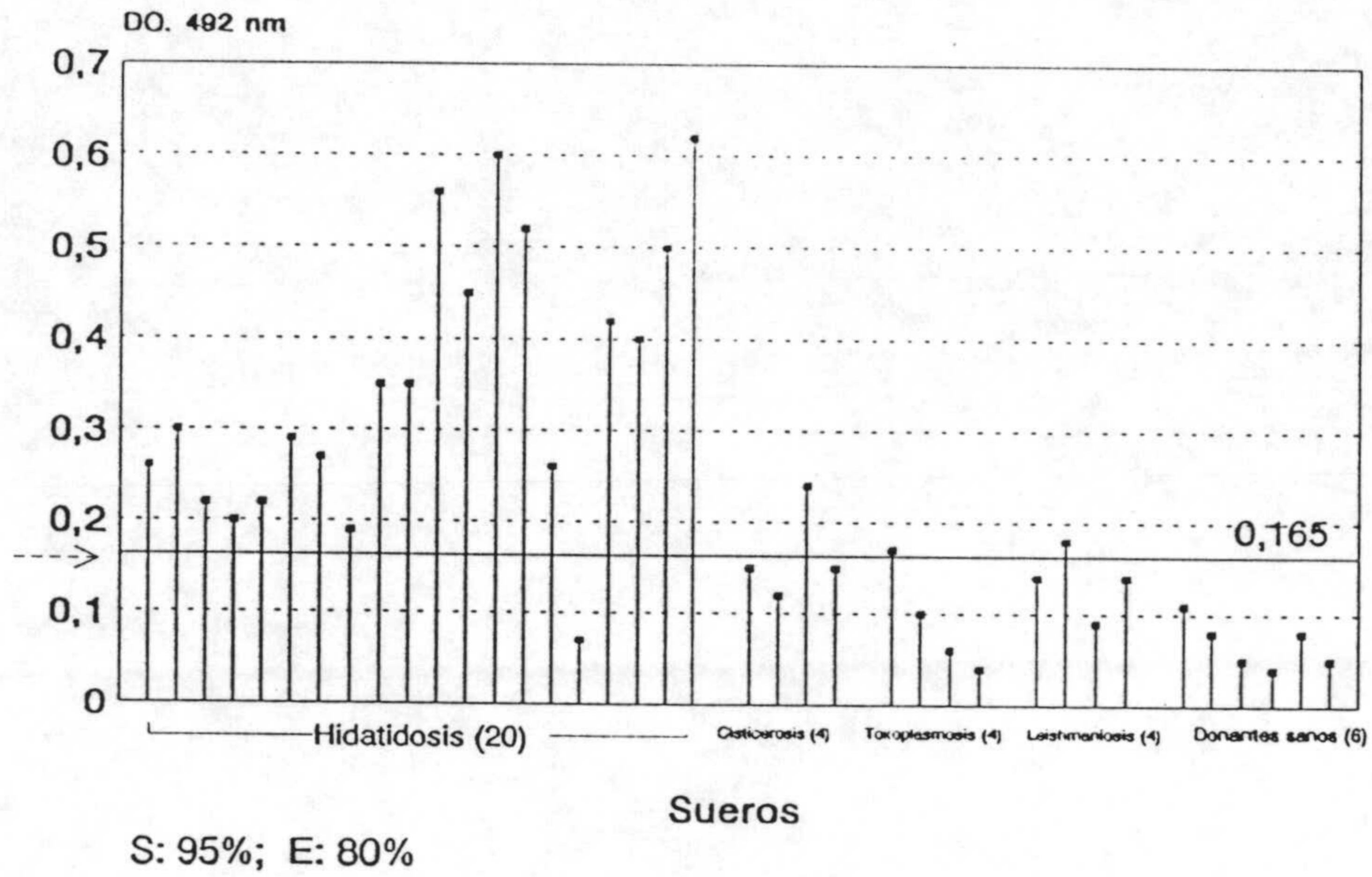
En la tabla 4.4, se reflejan de manera resumida los resultados de la técnica ELISA en la detección de anticuerpos de la clase G frente a las diferentes preparaciones antigénicas. Se deduce que la especificidad de la técnica aumenta especialmente cuando se utiliza la preparación antigénica purificada del líquido hidatídico según el método descrito por Oriol y col. (1971), enriquecida en antígenos B y 5. Resultados similares fueron obtenidos utilizando la fracción glicoproteica del LH obtenida por cromatografía de afinidad en Con A-Sepharosa.

Gráfica 4.1a:



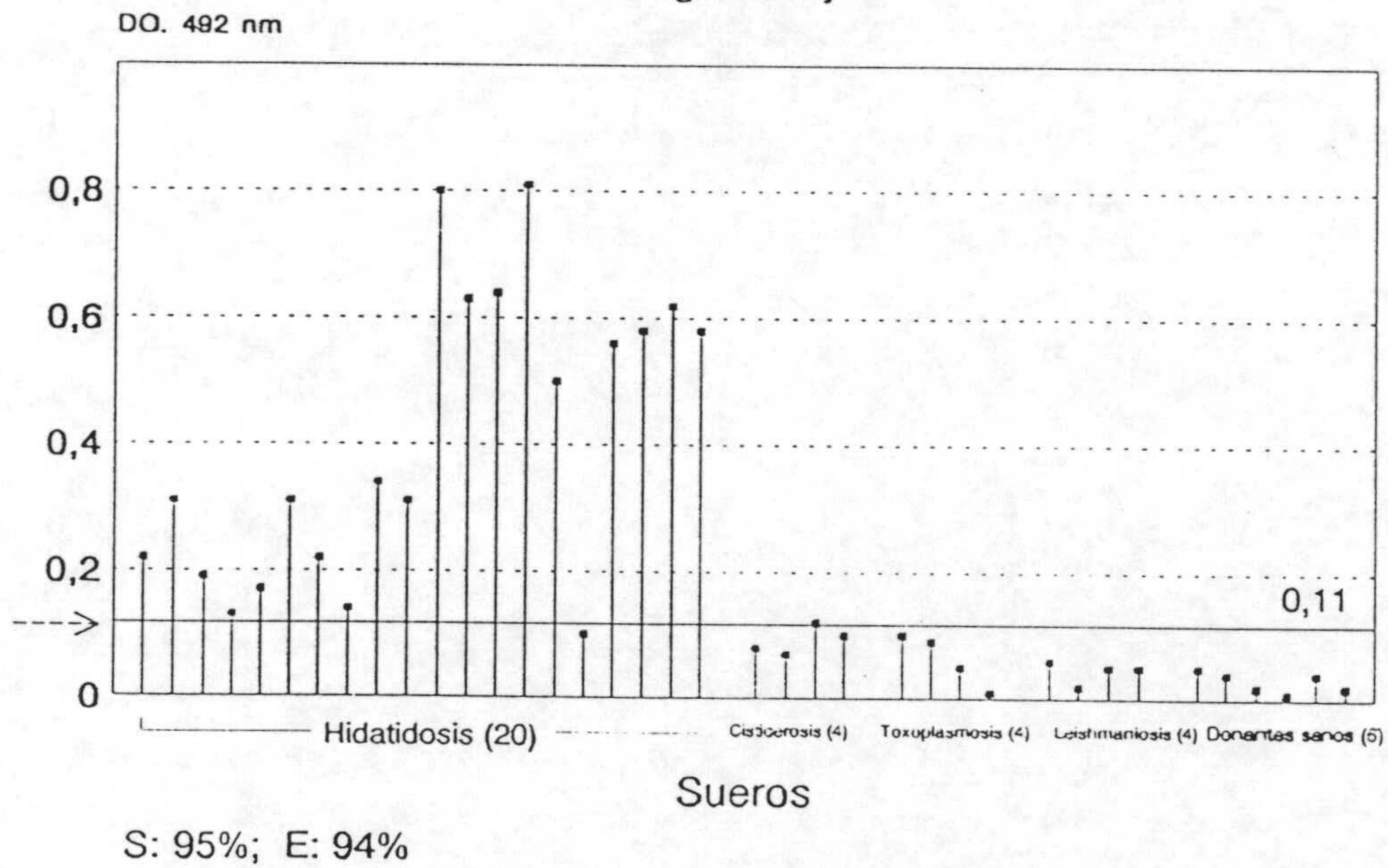
Gráfica 4.1b:

Standard Micro-ELISA
Líquido Hidatídico (LH)



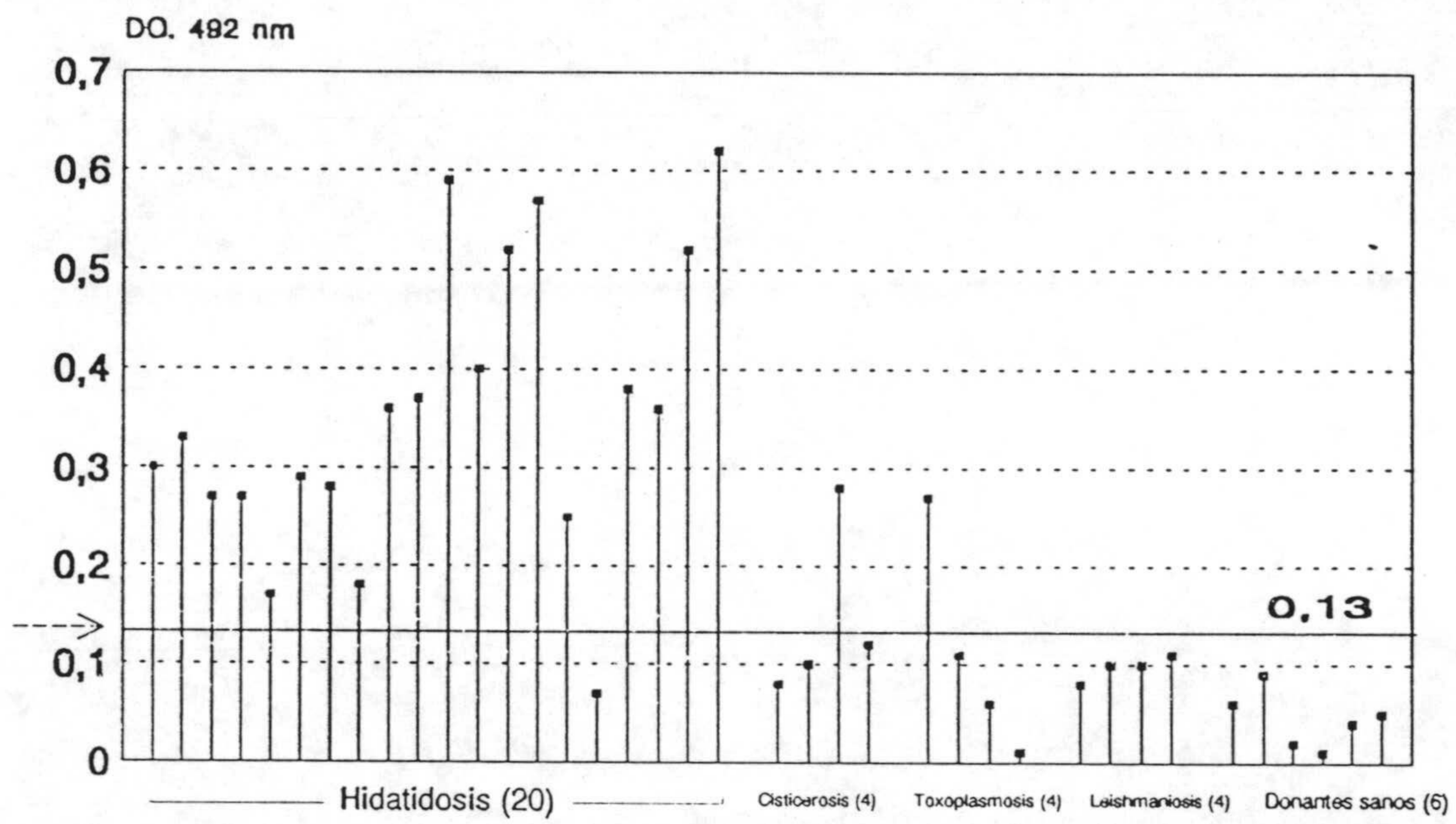
Gráfica 4.1c:

Standard Micro-ELISA
Antígenos B y 5



Gráfica 4.1d:

Standard Micro-ELISA Fracción glicoproteica



sueros

S: 95%; E: 89%

Tabla 4.4: Detección de los anticuerpos frente a diferentes antígenos por ELISA

DO (Media, (DS)) de los sueros de pacientes ensayados por ELISA frente:

(número de casos)	Protoescólices	N°+	LH total	N°+	Ag5/B	N°+	Glicoproteínas	N°+
Hidatidosis (20)	0.380 (0.150)	20	0.362 (0.160)	19	0.420 (0.240)	19	0.355 (0.143)	19
Cisticercosis (4)	0.185 (0.080)	2	0.165 (0.040)	1	0.090 (0.020)	1	0.145 (0.080)	1
Toxoplasmosis (4)	0.108 (0.030)	1	0.090 (0.050)	1	0.060 (0.030)	0	0.112 (0.090)	1
Leishmaniosis (4)	0.157 (0.060)	2	0.137 (0.030)	1	0.045 (0.015)	0	0.100 (0.010)	0
Donantes sanos (6)	0.070 (0.020)	0	0.070 (0.030)	0	0.038 (0.020)	0	0.040 (0.030)	0

4.4.2. Inmunotransferencia "Immunoblot" de los componentes de cuatro preparaciones antigénicas.

En el estudio del valor diagnóstico de las subunidades antigénicas del LH mediante inmunoblot, hemos podido encontrar contradicciones en la literatura respecto a la sensibilidad y especificidad que mostraban estos antígenos. Se deduce que su efectividad depende mucho del tipo de material usado para obtener el antígeno, que generalmente difiere de unos autores a otros, haciendo difíciles las comparaciones (Shepherd y McManus, 1987; Lightowlers y col., 1989; Siracusano y col., 1991; Leggatt y col., 1992).

En este apartado se llevaron a cabo técnicas de inmunotransferencia para analizar la reactividad de los sueros de pacientes (anticuerpos de clase G) frente a los antígenos de *E. granulosus* y evaluar su importancia en el diagnóstico de la hidatidosis humana.

Para este propósito se estudiaron 4 diferentes preparaciones antigénicas: LH bruto, fracción antígeno 5/B purificada según el procedimiento descrito por Rogan y col. (1990) basado en el método de Oriol y col. (1971), fracción glicoproteica obtenida mediante cromatografía a través Con A ligada a sepharosa y el homogenado de protoescolices.

El perfil electroforético en condiciones reductoras de cada preparación se muestra en la figura 4.13.

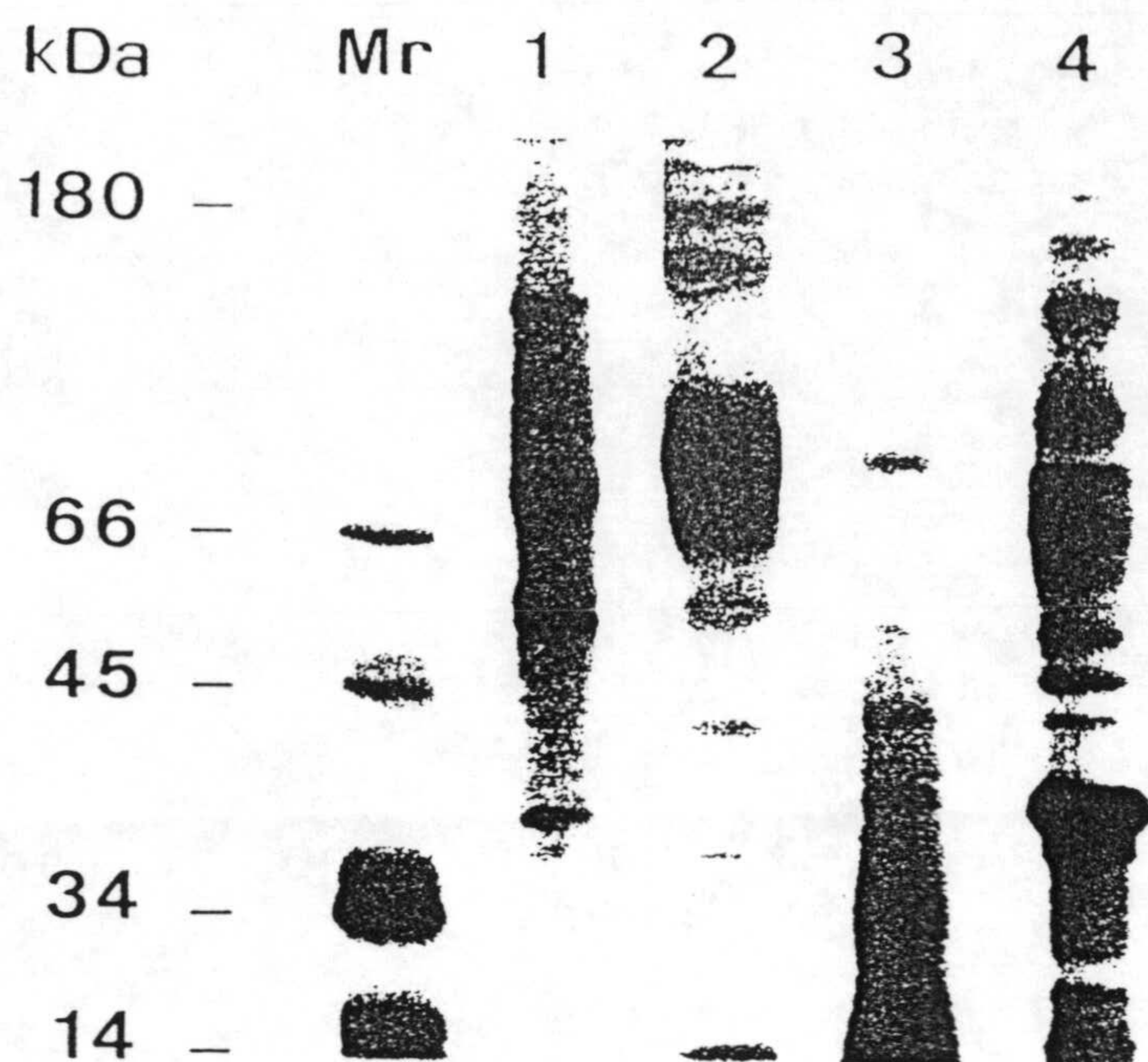


Fig.4.12. SDS-PAGE de las diferentes preparaciones antigénicas en condiciones reductoras.

Línea 1: homogenado de protoescólicas, 2: LH ovino, 3: fracción enriquecida con antígenos 5 y B, 4: fracción glicoproteica. Mr: proteínas marcadoras de peso molecular.

De manera resumida, hemos podido observar mediante los resultados obtenidos (figura 4.14a,b,c,d), que las bandas de 12-14, 20 y 34 kDa purificadas del líquido hidatídico por intercambio iónico, mostraron una sensibilidad (95%) y especificidad (100%) extrema para el inmunodiagnóstico, y no presentaron reacciones cruzadas. Por el contrario, cuando el LH fué sometido a una cromatografía a través de una columna de Con A, se obtuvo una banda de 42 kDa muy específica y sensible frente a la hidatidosis. Las comparaciones de las subunidades mayoritarias se reflejan detalladamente en la tabla 4.5 y la tabla 4.6.

La figura 4.14a,b,c,d representan el inmunoblot frente a, A: 20 sueros individuales de pacientes con hidatidosis, B: sueros controles; (1) seis sueros de donantes sanos, (2) cuatro de leishmaniosis, (3) cuatro de toxoplasmosis y (4) cuatro de cisticercosis.

Fig 4.14a: Homogenados de protozoos.

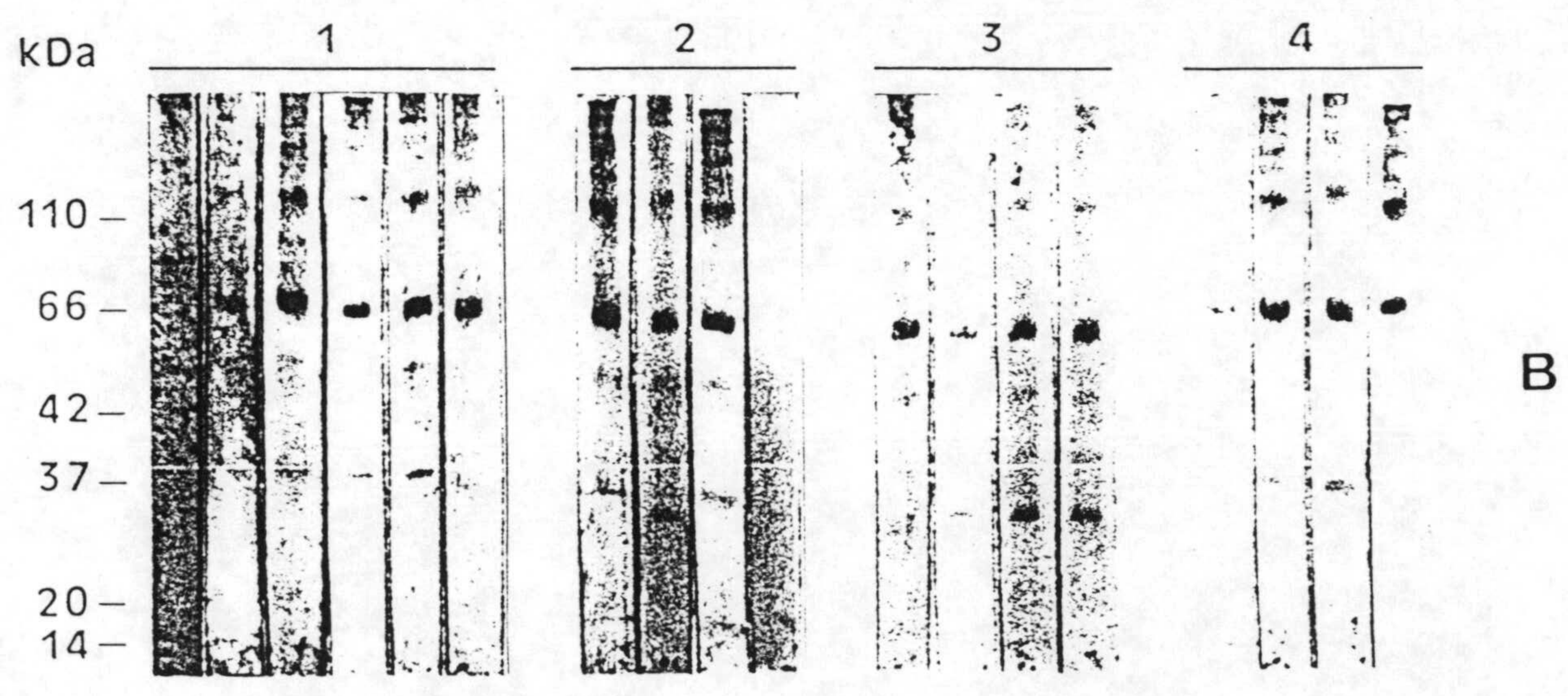
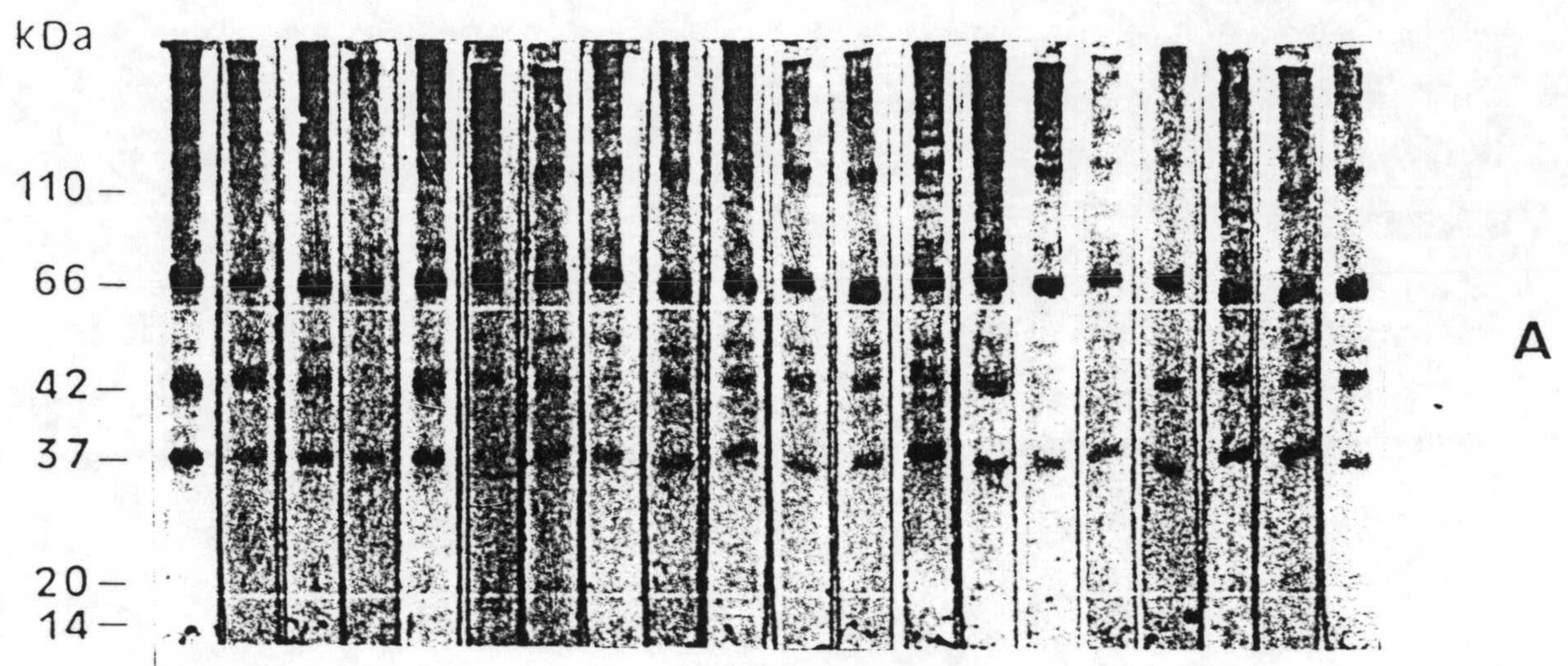


Fig 4.146: L.H

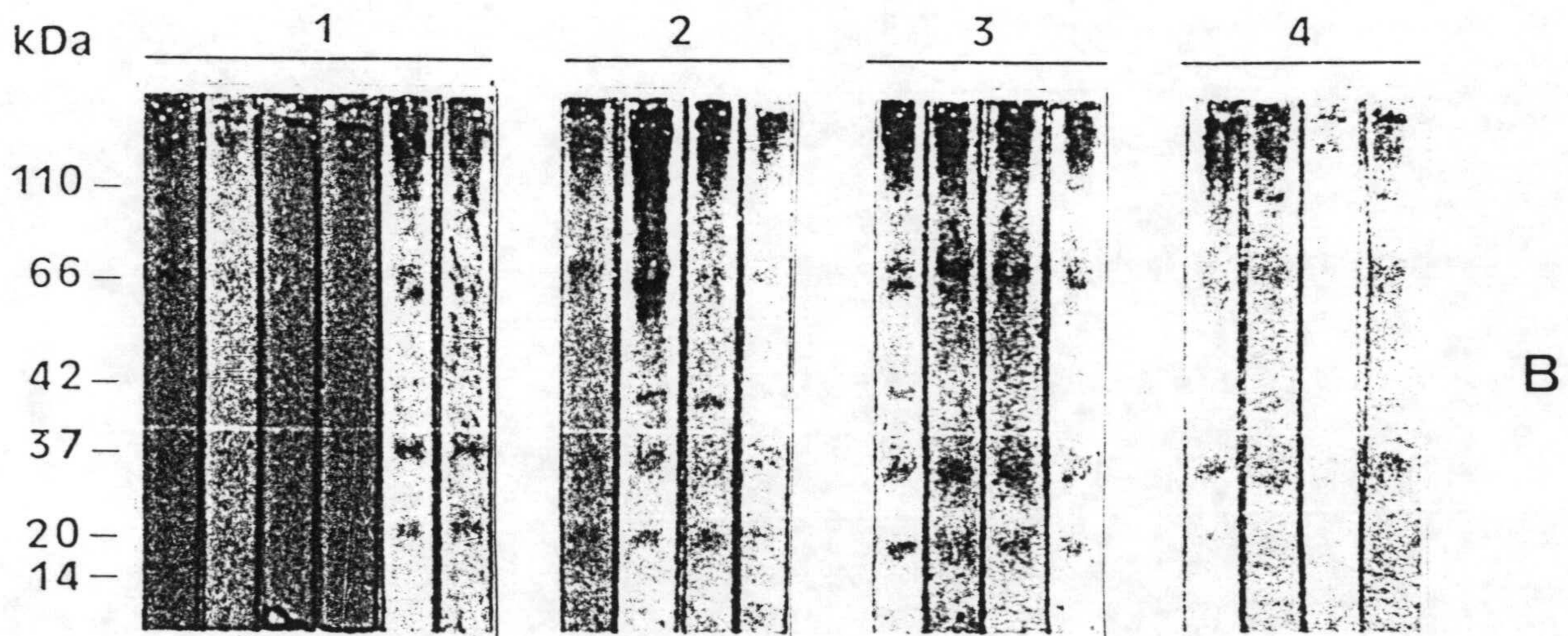
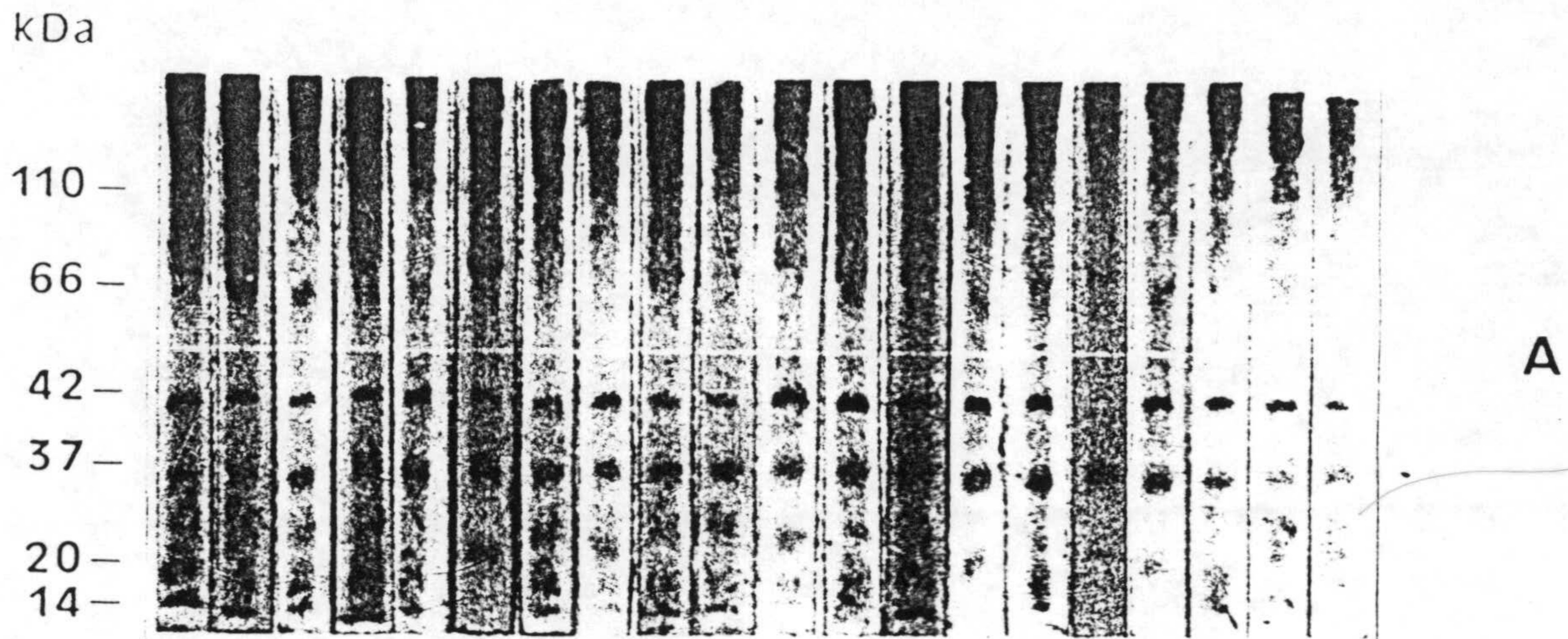


Fig 4 14c: Antigens 2 y 5 .

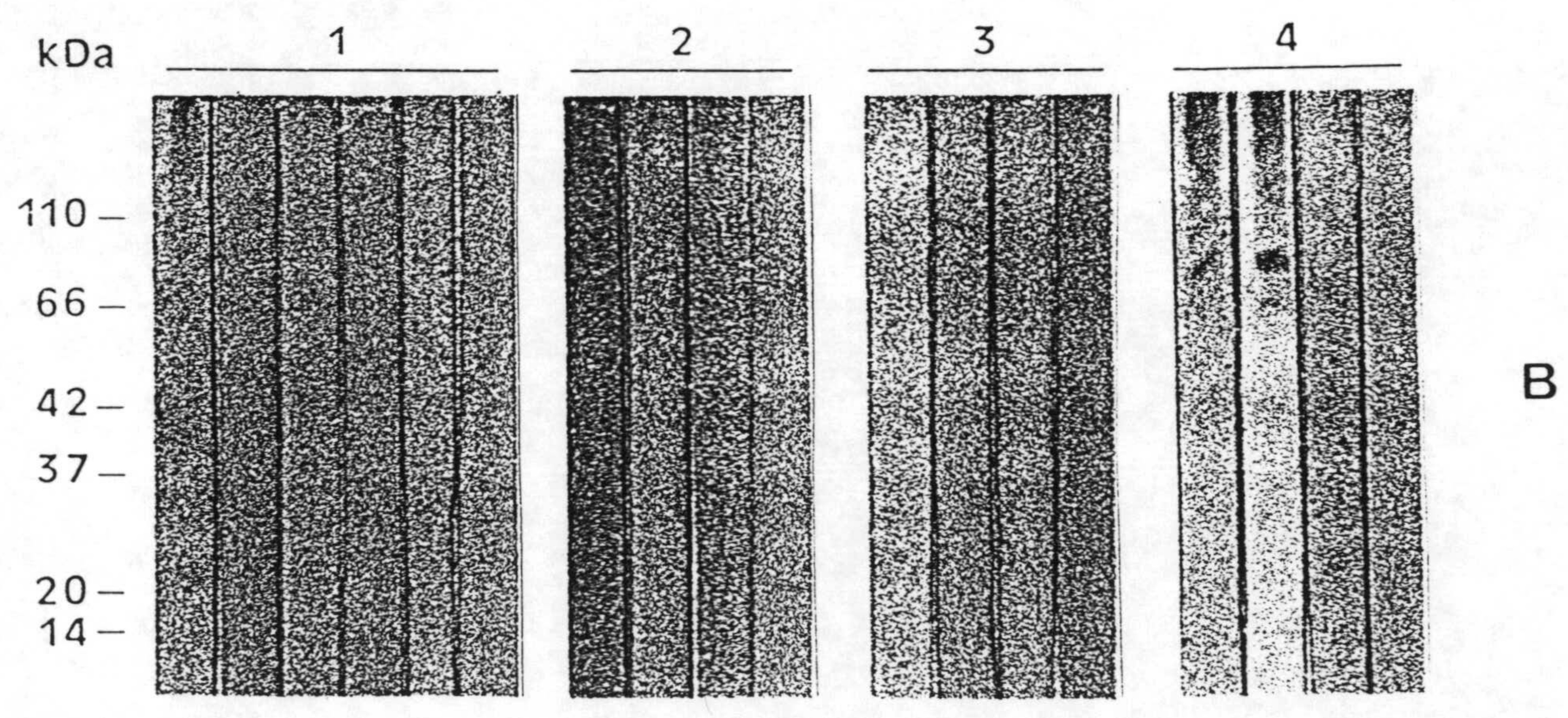
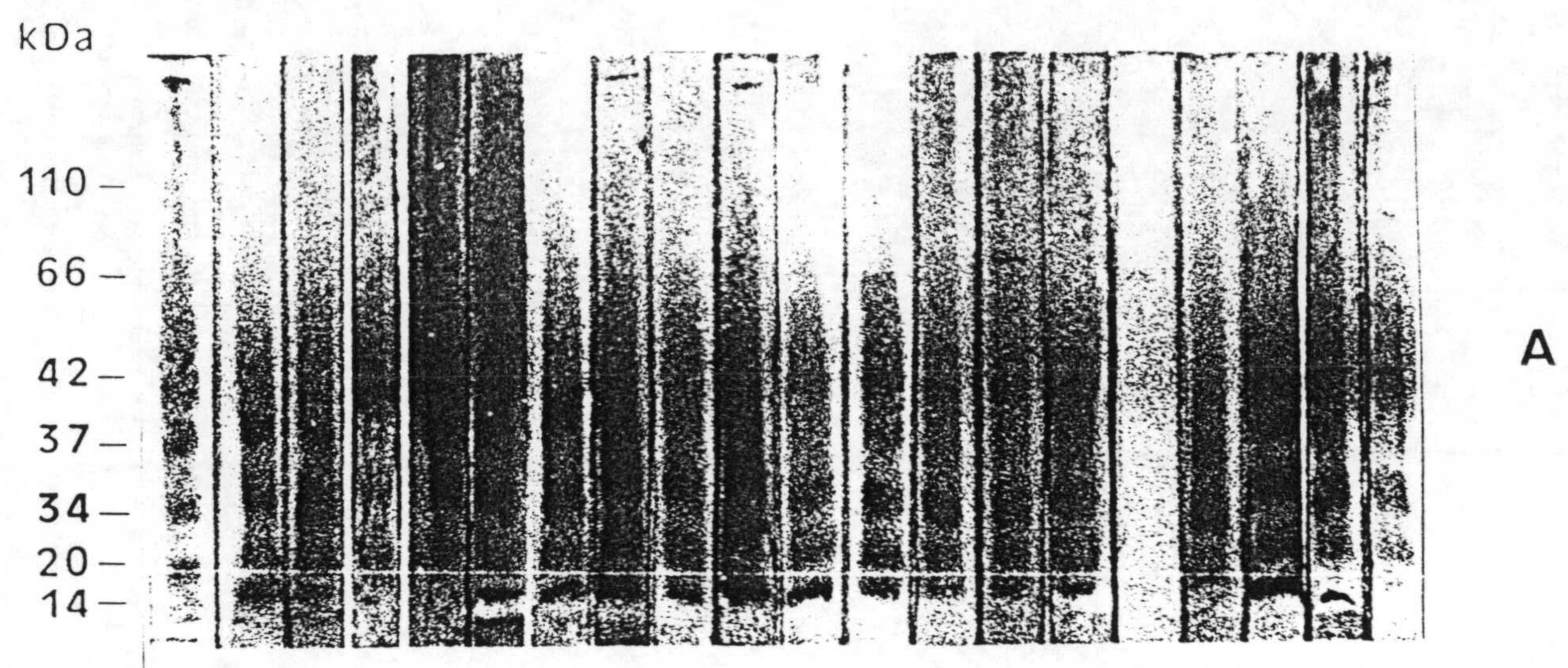


Fig 4.14d: Fracción glicoproteica.

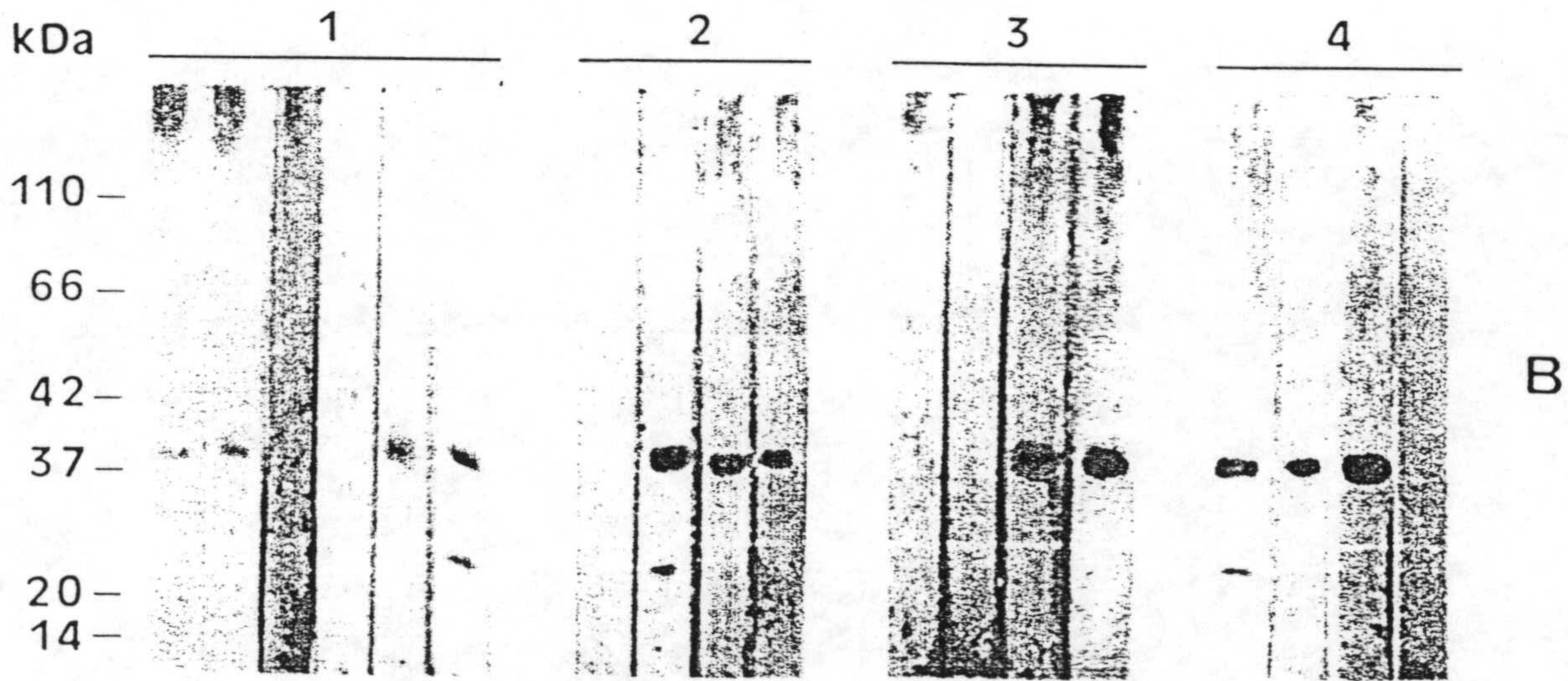
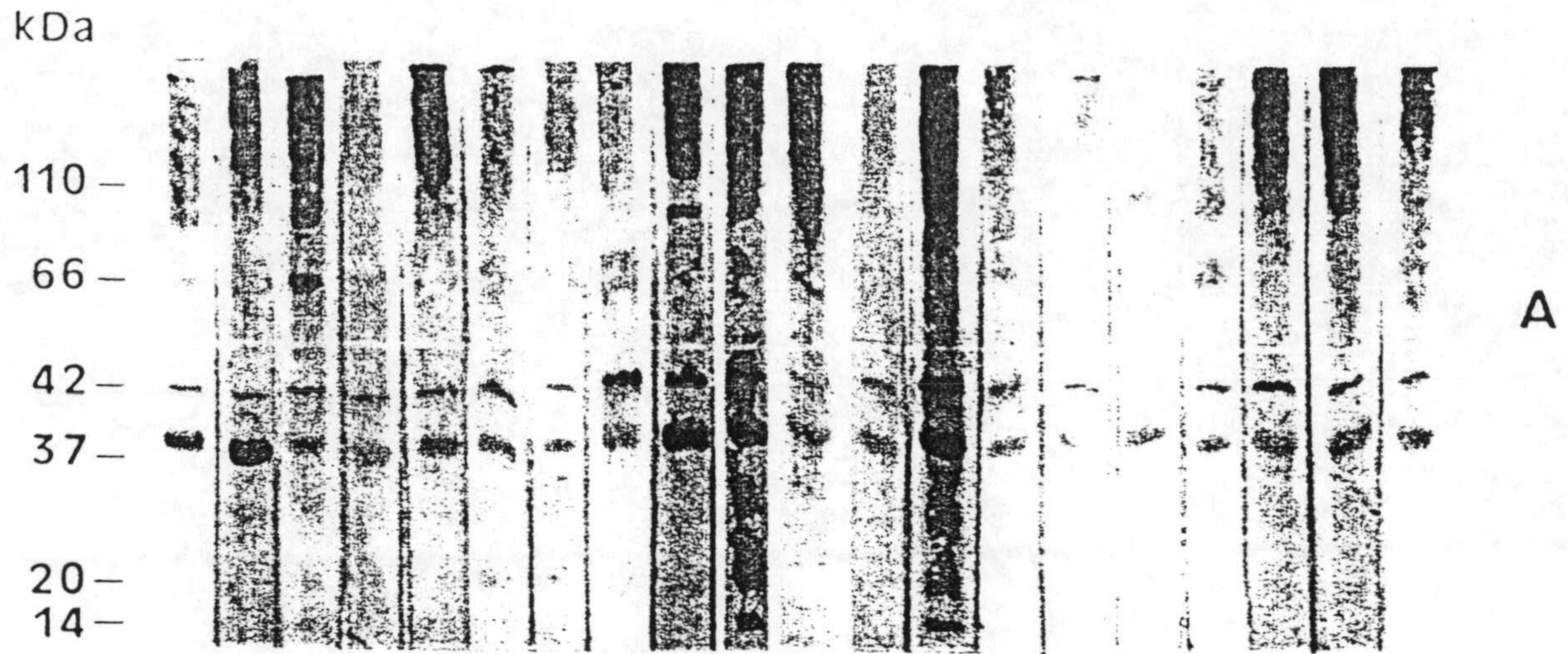


Table 4.5: Reactividad de los antígenos mayoritarios frente a los sueros de pacientes con hidatidosis y a los sueros controles por inmunotransferencia.

Número de sueros positivos por inmunoblot																				
Fuente de antígenos y P.M de los polipeptidos (kDa)																				
(Número de casos)	PS			HF						Ag5/B					GP					
	37	42	110	12-14	20	34	37	42	110	12-14	20	34	39	42	12-14	20	34	37	42	110
Hidatidosis (20)	20	16	6	15	20	15	20	19	20	19	19	19	18	16	6	10	9	20	19	18
Cisticercosis (4)	4	0	0	0	0	0	3	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	0
Toxoplasmosis (4)	3	0	0	0	4	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Leishmaniosis (4)	3	0	0	0	4	0	4	2	2	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	0
Controles sanos (6)	3	0	0	0	2	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	0	0

(PS) Homogenado de protoescólicas; (HF) LH total; (Ag5/B) Antígenos de HF enriquecidos en antígenos 5 y B; (GP) Glicoproteínas.

Table 4.6:

Criterios	El valor en porcentaje de los ensayos			
	ELISA		inmunoblotting de los polipeptidos	
	Ag5/B	GP	42 kDa (Ag5/B)	42 kDa (GP)
Sensibilidad	95	95	80	95
Specificidad	94	89	100	100

Por lo tanto, podemos deducir que las diferencias que mostraron estas subunidades no sólo dependen del tipo de preparación utilizada, sino también que los mismos procedimientos utilizados para la purificación de antígenos con valor diagnóstico, pueden afectar el comportamiento de éstos teniendo una movilidad electroforética similar.

4.4.3. Reactividad diferencial específica de de las inmunoglobulinas G, A y E por inmunoblot.

Los pacientes infectados por *E. granulosus* 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 anticuerpos de clases IgA, IgE e IgM (Abril y Guisantes, 1988; Shweiki y col., 1992).

En este apartado, se pretende estudiar la especificidad diferencial de estas inmunoglobulinas en la hidatidosis. Para este propósito hemos realizado un inmunoblot de tres preparaciones antigénicas obtenidas del LH ovino frente a 3 pools de sueros (desprovistos de IgG utilizando proteína G-sepharosa Fast Flow, Pharmacia Biotech.) de pacientes con hidatidosis, y sueros de cisticercosis (*T.solium*) y de donantes sanos como controles, detectando separadamente las IgM, IgA e IgE.

En el apartado anterior se presentaron los resultados de la detección de la IgG. En nuestro sistema no hemos podido detectar la IgM específica. Sin embargo, se demuestra la presencia de IgA específica que se revela frente a una banda de aproximadamente 42 kDa en las tres preparaciones antigénicas y frente a otra banda de 110 kDa en la frección glicoproteica (figura 4.15).

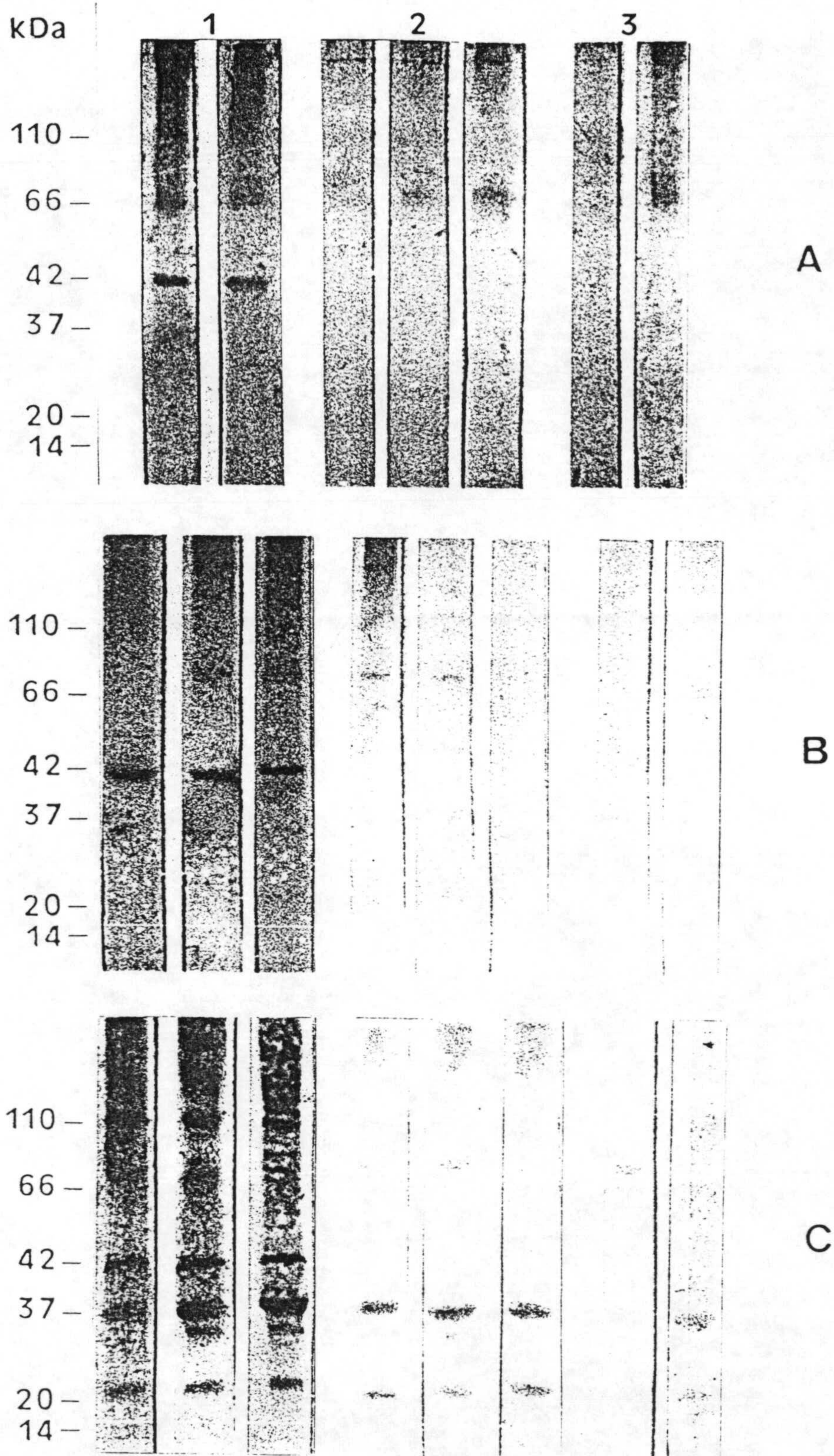
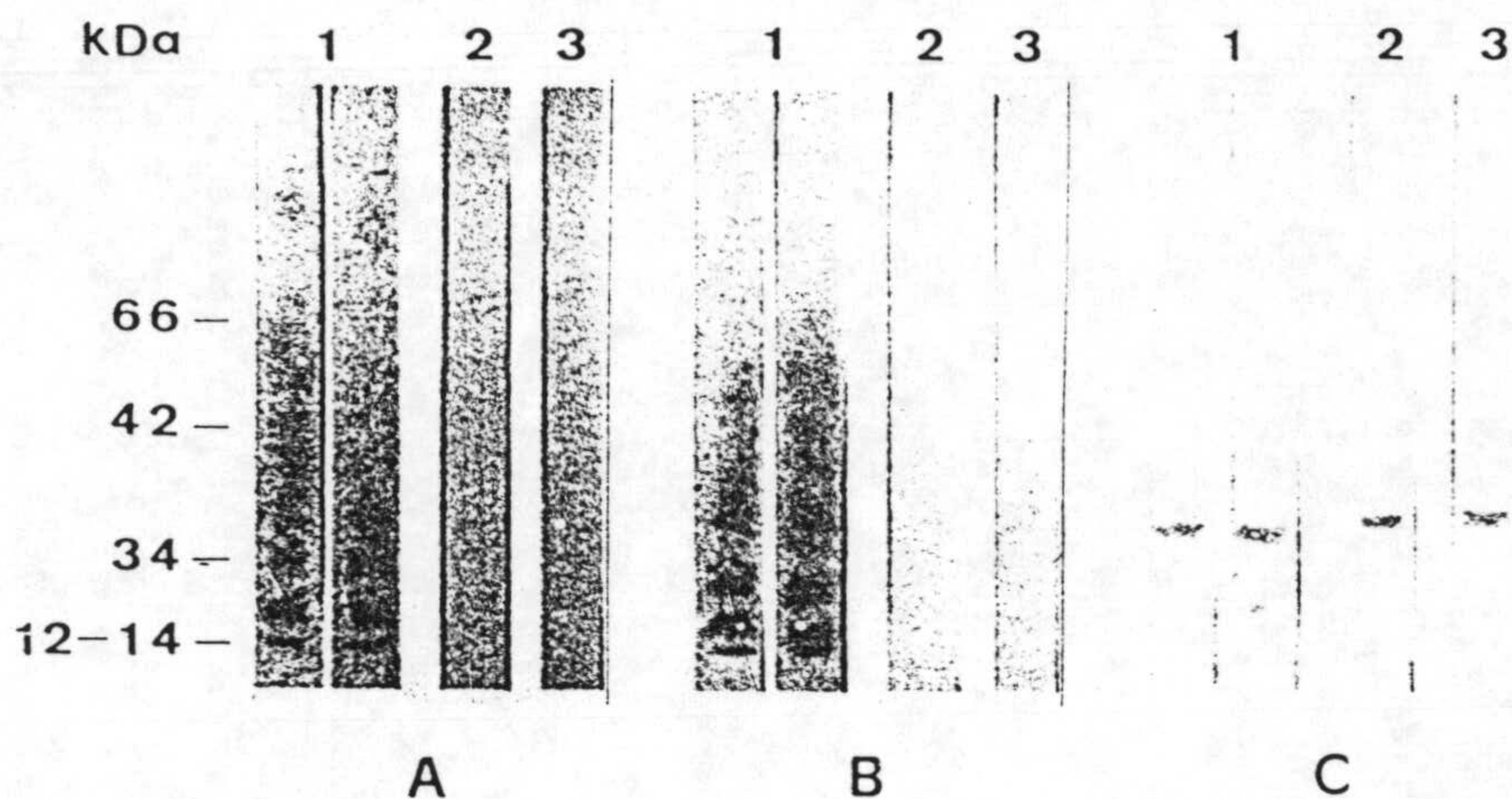


Fig.4.15. Inmunotransferencia de las subunidades de las tres preparaciones antigénicas: A- LH total; B- fracción Ag 5/B; C- fracción glicoproteica, frente a pools de sueros de pacientes con hidatidosis (1), y sueros de cisticercosis (2) y de donantes sanos (3) como controles. Utilizando como segundo anticuerpo anti-IgA, y anti-IgE (fig.4.16).

Figura 4.16:



La IgE ha reaccionado de forma específica frente a una serie de subunidades de bajo peso molecular entre 12 y 37 kDa tanto en el LH total como en la fracción Ag 5/B purificada según el método de Oriol y col. (1971). Sin embargo, en la fracción glicoproteica no se detectó IgE específica (figura 4.16).

En la tabla 4.7, se expresan claramente las subunidades específicas reaccionadas diferencialmente frente a estas inmunoglobulinas (Ig).

Tabla 4.7:

Antígenos utilizados	Subunidades en kDa reconocidas específicamente por las Ig		
	IgA	IgE	IgG
Líquido hidatídico	42	12-37	12-14
Fracción Ag 5/B	40-42	12-40	12-40
Frac. glicoproteica	110, 42	-	42

En definitiva podemos deducir que las técnicas de inmunotransferencia "inmunoblot" permite claramente determinar la reactividad específica diferencial de las distintas inmunoglobulinas.

4.4.4. Caracterización del componente de la fracción Ag 5/B anti-IgA de pacientes.

En el apartado anterior se demostró que la IgA de suero de pacientes con hidatidosis reconoce una sola subunidad específica de aproximadamente 42 kDa en la fracción Ag 5/B, por lo tanto en el presente experimento pretendemos averiguar su punto isoeléctrico utilizando una inmunoelectrotransferencia tras una electroforesis bidimensional.

Los resultados reflejados en la figura 4.17 demuestran que esta subunidad presenta un punto isoeléctrico de 5,8.

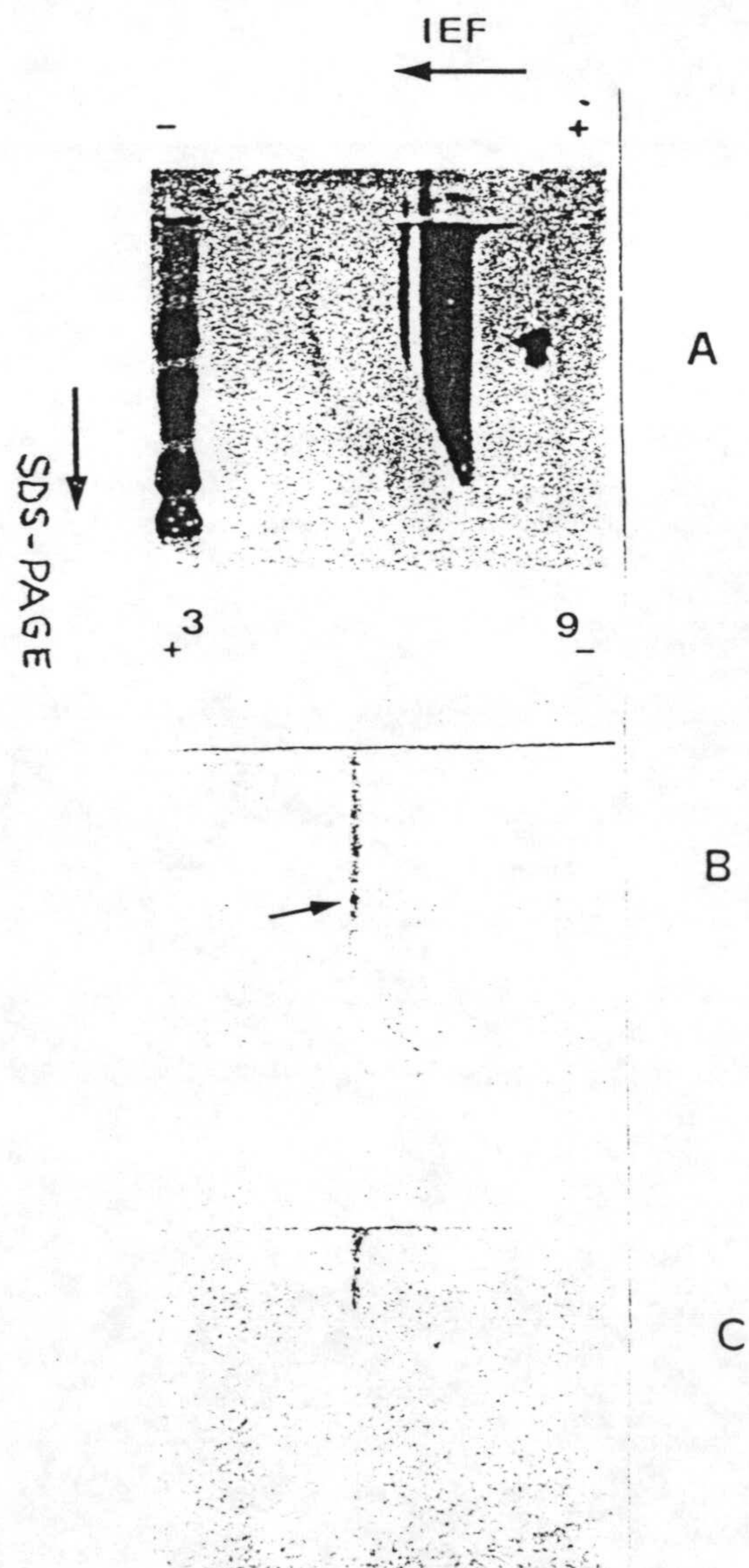
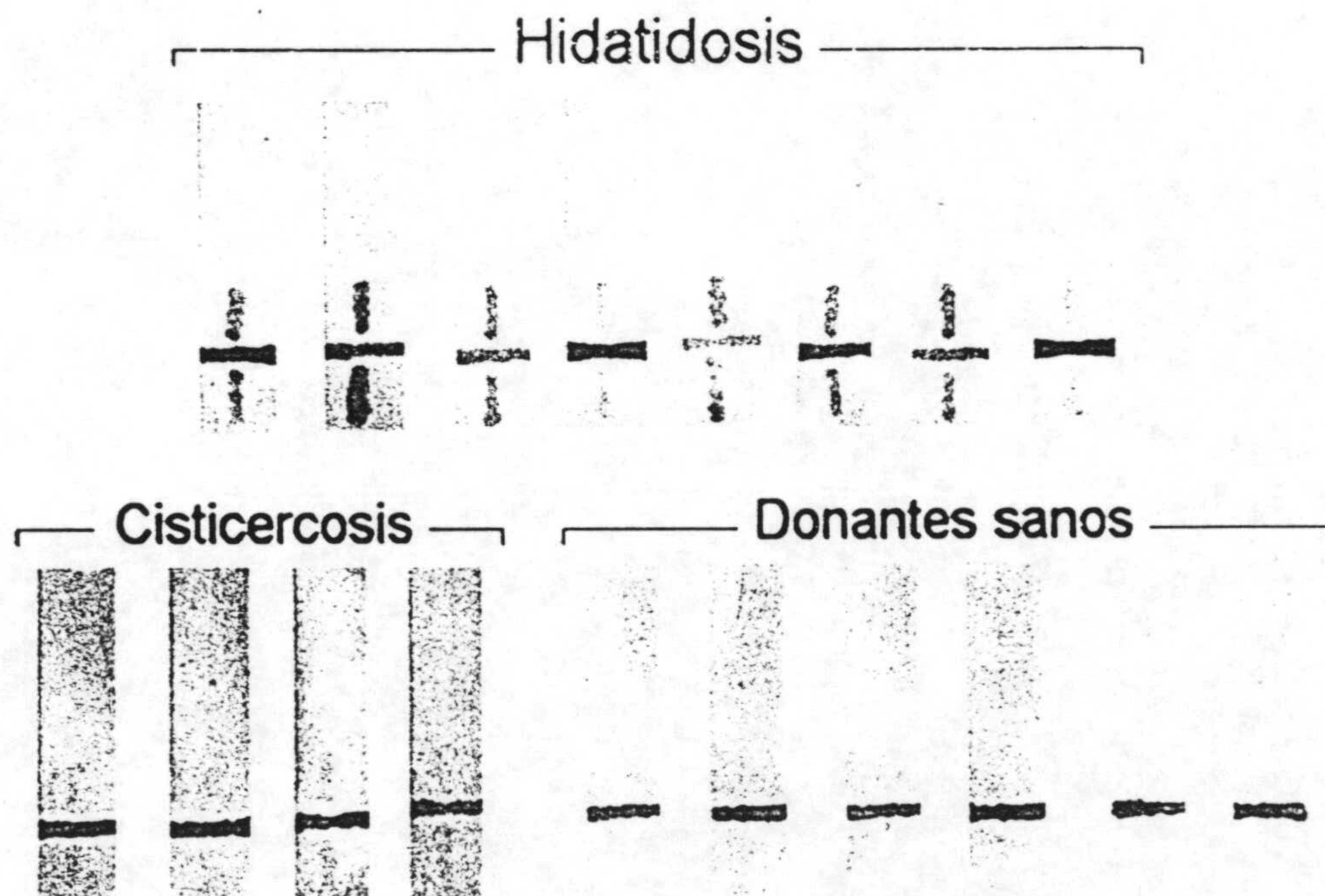


Fig.4.17. La fracción Ag 5/B fué sometida a separación en una electroforesis bidimensional (A), el gel se transfirió a membrana de nitrocelulosa y luego se procedió a la incubación con suero de pacientes con hidatidosis (B) y suero de donantes sanos (C).

4.4.5. Resultados de Dot-ELISA.

El Dot-ELISA es una prueba de diagnóstico relativamente rápida (aproximadamente 30 min), en la hidatidosis fué desarrollada para llevar a cabo estudios epidemiológicos. Es una técnica descrita por varios autores especialmente por Rogan y col. (1991) donde obtuvo resultados muy interesantes respecto a la sensibilidad (94%) y especificidad (90,3%) que ofrece la técnica. Aquí la hemos aplicado utilizando la fracción enriquecida por el antígeno 5 y B purificada según Oriol y col. (1971), para obtener información preliminar acerca del uso de dicho antígeno en pruebas rápidas de diagnóstico de la hidatidosis.

Fig.4.18. Dot-ELISA para la hidatidosis.

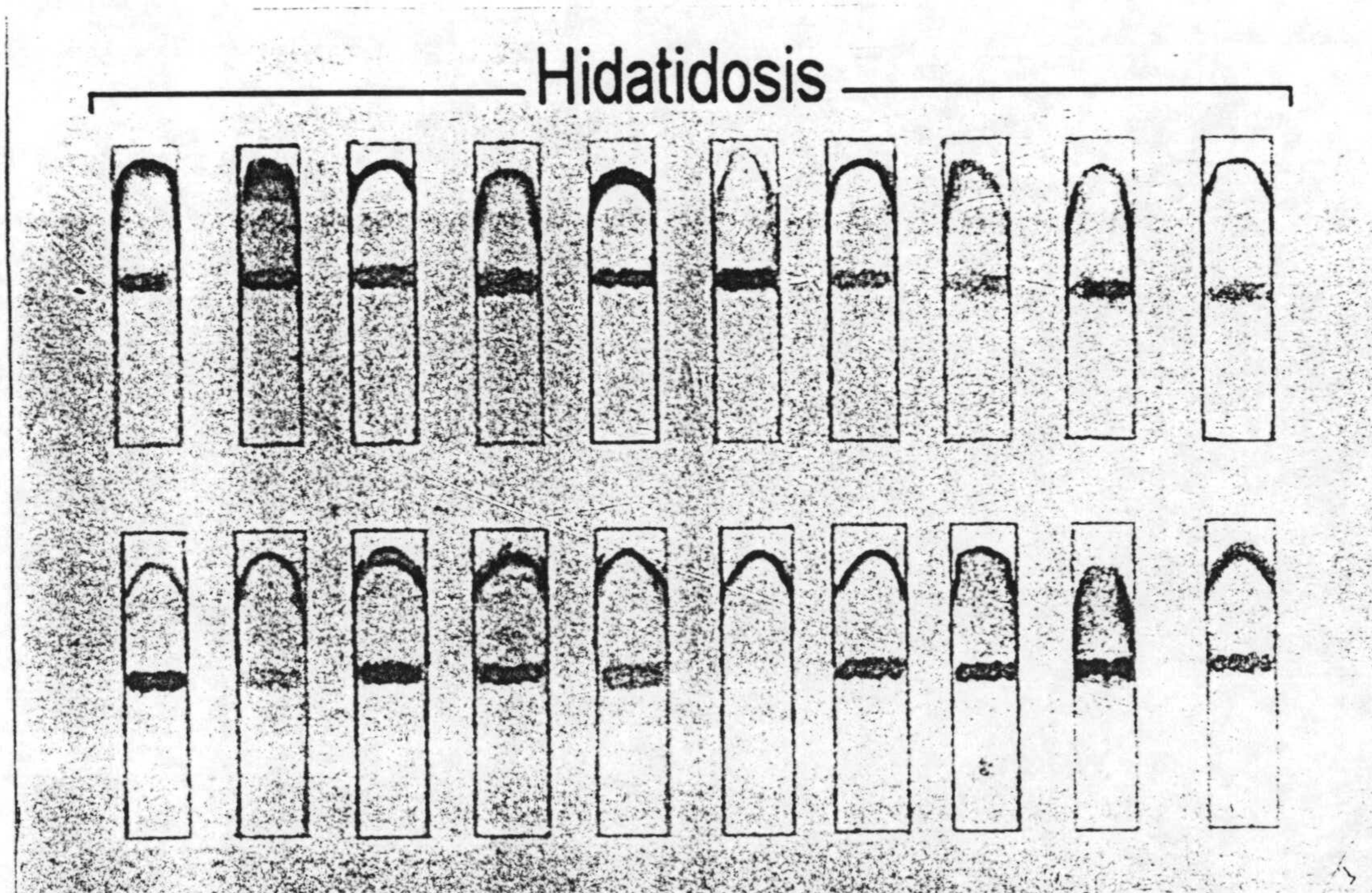


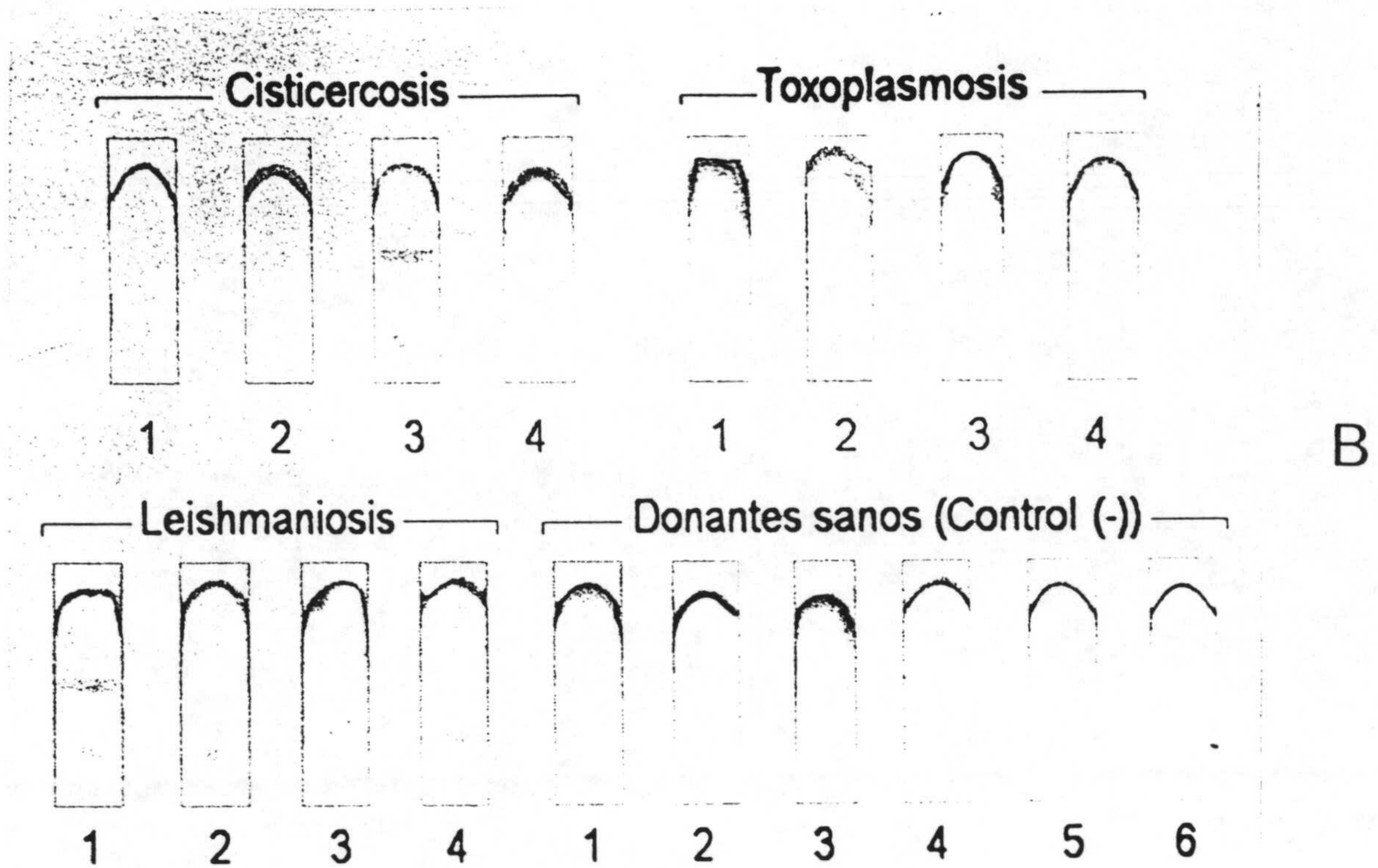
4.5. Desarrollo de un "Kit" de diagnóstico para la hidatidosis.

La técnica se basa en un ensayo conocido como "Gold immunoassay", utilizado ampliamente en estudios inmunocitoquímicos para microscopia electrónica. En nuestro laboratorio, dicho ensayo lo hemos adaptado para su utilización en ensayos inmunoserológicos, desarrollando un procedimiento de aproximadamente 25 min para el diagnóstico de la hidatidosis humana.

En el apartado de material y métodos describimos detalladamente la preparación del conjugado metálico, la tira reactiva y el procedimiento a seguir. Los resultados se reflejan en la figura 4.19.

Fig.4.19. "Gold immunoassay" en la hidatidosis.
(A) sueros individuales de pacientes con hidatidosis.
(B) sueros controles.



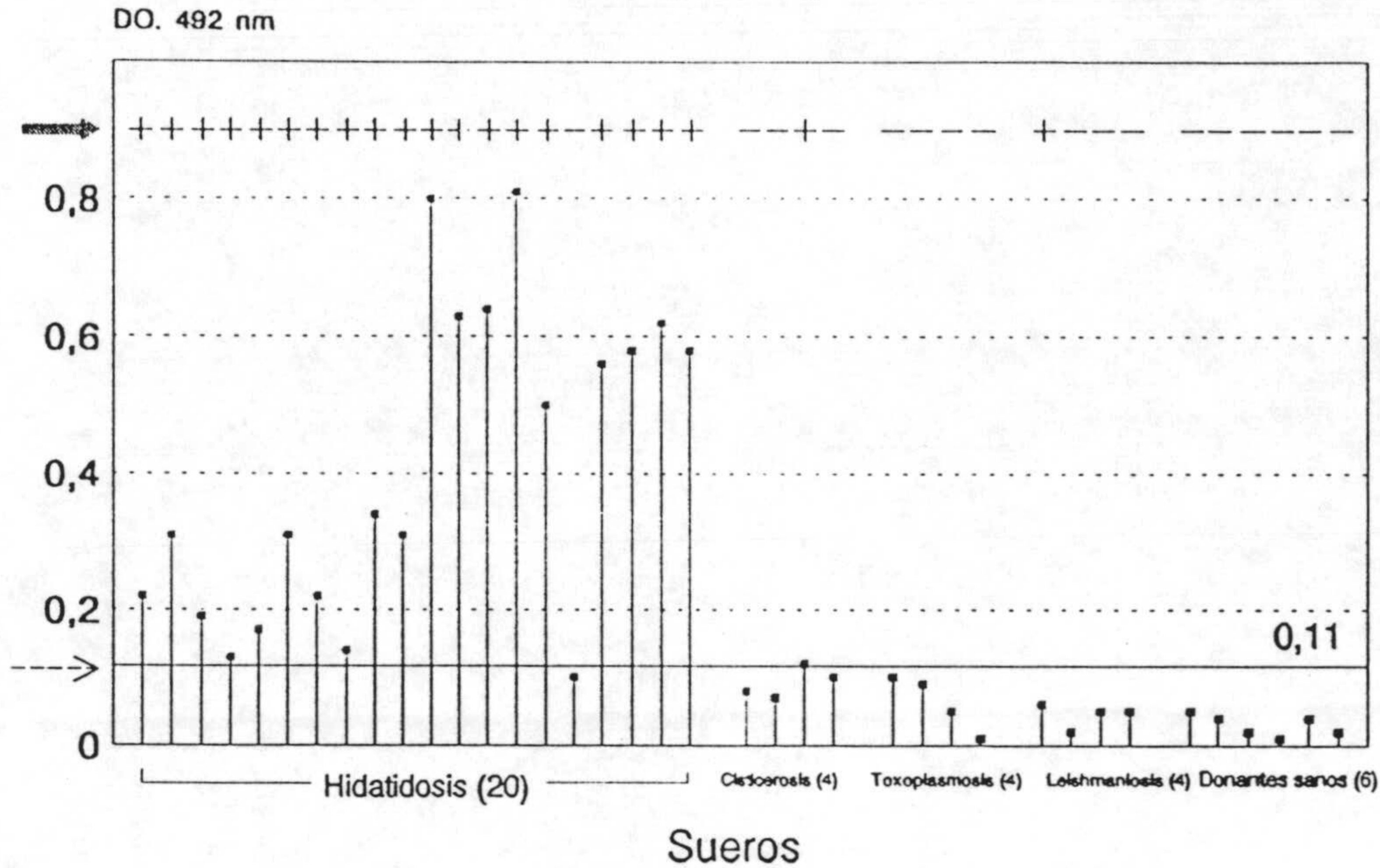


4.5.1. Fiabilidad y especificidad del "Kit".

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

Para ello se utilizaron los resultados del test inmunoenzimático (ELISA, Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) descrito por Rogan M.T y col. (1991), con el mismo antígeno. Los resultados obtenidos son coincidentes con los obtenidos con el "Kit" (gráfica 4.2), salvo en uno de los sueros de leishmaniosis que por la técnica ELISA resultó negativo mientras que procesado por el "Kit" dió positivo.

Standard Micro-ELISA
Antígenos B y 5



Gráf. 4.2: Comparación de los resultados de micro-ELISA (■) y del Kit (→). La línea que se indica (--->) representa el "valor de corte" de la absorbancia equivalente a 0,11.

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 Inmunología (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. Los resultados aparecen en la tabla 4.8, y la correlación con el "Kit" se refleja en la tabla 4.9, donde puede verse la detección de tres falsos positivos con el test de aglutinación, y dos con el "Kit".

Tabla 4.8:

Aglutinación de látex				
Parasitosis (Nú. casos)	Resultados (Nº de sueros)			
Hidatidosis (20)	+++ (5)	++ (5)	+(8)	-(2)
Cisticercosis (4)	+++ (1)	++ (1)		-(2)
Toxoplasmosis (4)				-(4)
Leishmaniosis (4)			+(1)	-(3)
Donantes sanos (6)				-(6)

+++ Agregados grandes sobre fondo transparente.

++ Agregados medianos sobre fondo ligeramente turbio.

+ Agregados pequeños sobre fondo turbio.

- Ausencia de aglutinación (Aspecto uniforme).

Tabla 4.9:

Correlación entre el test de aglutinación y el "Kit"			
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

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN.

La hidatidosis humana es una enfermedad que se caracteriza por su curso crónico, desencadenando una intensa respuesta inmunitaria humoral con títulos elevados de anticuerpos específicos. En esta respuesta predominan los anticuerpos de clase IgG, pero también se detectan anticuerpos de clase IgM, IgA, IgE. En este trabajo estas inmunoglobulinas reconocen, en el LH, por cromatografía de afinidad 8 antígenos de diferente peso molecular, 3 de ellos han sido reconocidos por las tres clases de Ig. 5 antígenos fueron diferencialmente reconocidos dependiendo de la clase de Ig (figura 1, Tabla 1). Esto podría estar relacionado a que la detección de anticuerpos de clase IgM o IgA sugiere la existencia de quistes en actividad (D'Amelio y col. 1989; Craig, P.S. 1986), pero su detección es muy inconstante aunque se utilicen métodos de elevada sensibilidad.

La identificación de los antígenos purificados por cromatografía de afinidad se llevo a cabo de manera tentativa; otros autores detectan por inmunotransferencia más de 40 componentes antigénicos de distintos pesos moleculares, siendo los antígenos más inmunoreactivos los antígenos 5 y B (39). El antígeno B es una lipoproteína formada por tres subunidades de 12, 16 y 20 kDa unidas de forma no covalente (2,20). La banda de 8 kDa, altamente específica para la hidatidosis de acuerdo con algunos (Maddison y col. 1989), pero también muestra reacciones cruzadas de acuerdo con otros autores (Ferreira, H.B, and Zaha, A 1990), ha sido asociada a este antígeno. Probablemente, debido al tipo de gel de electroforesis utilizado en el presente estudio, no hemos detectado similaridad al antígeno B. El antígeno 5 es una lipoproteína, formado por subunidades de 52-62 kDa unidas de forma no covalente; cada una de estas subunidades puede ser reducida con 2-mercaptoetanol, dando lugar a dos monómeros de 40 y de 20 kDa. Queralt et al. 1989 describe que el antígeno 5 migra en SDS-PAGE en las áreas de 65 y 37 kDa bajo condiciones no reductoras y reductoras respectivamente.

Bajo las condiciones reductoras de SDS-PAGE, de los antígenos retenidos se detectaron 2 bandas, de 64-66 kDa y de 34-37 kDa (figura 1), que pueden estar relacionados con el Ag5. Por otro lado, esta última banda podría corresponder a la proteína de 32 kDa descrita por Gadea y Garcia-de-lomas (1991) considerando que se detecta especialmente en pacientes con hidatidosis primaria, hidatidosis secundaria y ausente en pacientes curados o en controles sanos. Entre otros antígenos, descritos por estos autores, bandas de 118 y 38 kDa mostraron gran especificidad; en nuestros experimentos, componentes similares (120 y 38 kDa) fueron reconocidos por IgM, IgE y IgA de pacientes, en sueros de los mismos pacientes, pero no en el líquido hidatídico o en sueros de donantes sanos (figura 2 y 3). E igualmente, Queralt et al.(1989) describe una banda de 85 kDa que no presenta ninguna reacción cruzada con anticuerpos frente a otros parásitos helmínticos. La banda de 80 kDa, retenida en el LH (fig.1), podría ser relacionada con este antígeno, si bien una banda de 89 kDa ha sido también encontrada en sueros de pacientes (fig.2).

Respecto a otros antígenos, los de 34, 40, 52, 104 y 120 kDa, estos componentes pueden estar asociados a la infección (enfermedad), estando presentes en el líquido hidatídico a un nivel bajo de los límites de detección del procedimiento utilizado, pero detectables en sueros de pacientes como antígenos circulantes, o bien en forma de complejo antígeno-anticuerpo. Por otro lado, el hecho de que los antígenos de LH, y los antígenos en suero de pacientes son muy distinguibles, sugiere que la mayoría de las 12 bandas, reconocidas por las Ig de pacientes en sueros de la misma procedencia, son de origen del hospedador. Esto se confirma en el experimento control donde se revelaron 4 bandas mayoritarias (fig.3 tab.2). Los determinantes de 37 y 55-60 kDa se mostraron únicos para el suero control, mientras los de 66, 75 y 89 kDa son también detectados en sueros de pacientes (fig. 3). La albúmina (66,248 kDa), como inmunoglobulinas del hospedador podrían estar entre estos antígenos (coltorti, E.A et al. 1972). Debido a la estimulación antigénica

prolongada y ala activación policlonal inespecífica de los linfocitos B, relacionadas a la enfermedad, pueden detectarse niveles elevados de inmunocomplejos, factores reumatoides frente a diferentes isotipos de inmunoglobulinas, anticuerpos anti-Fab' y otros autoanticuerpos .

En el presente, el diagnóstico morfológico de la hidatidosis (*Echinococcus granulosus*) es factible mediante técnicas de imagen (Radiografía digital, Ultrasonografía, Tomografía computerizada, Resonancia magnética nuclear) que aportan información esencial sobre la localización de los quistes. Sin embargo, el diagnóstico clínico se basa en una presunción que necesita una confirmación específica, mediante el inmunodiagnóstico, para diferenciar La hidatidosis de otras patologías quísticas o tumorales (Hira y col., 1993; Babba y col., 1994).

La aparición de anticuerpos específicos en pacientes con hidatidosis ha sido demostrada mediante técnicas como la hemaglutinación indirecta, aglutinación de látex, inmunolectroforesis, fijación del complemento e inmunofluorescencia indirecta (Rickard y Lightowers, 1985). Además, La técnica de ELISA se considera efectiva para la evaluación del estado inmunoserológico del paciente (Farag y col., 1975). Sin embargo, podemos encontrar aparentemente contradicciones en la literatura sobre el tema, con respecto a la sensibilidad y especificidad de los ensayos. Su efectividad depende tanto de la fuente como de la fracción antigénica utilizada, que generalmente difieren de unos autores a otros, haciendo difíciles las comparaciones (Shepherd y McManus, 1987; Lightowers y col., 1989; Siracusano y col., 1991; Leggatt y col., 1992).

La inmunotransferencia (Western Blotting) de antígenos hidatídicos, seguido de ELISA confirma la importancia diagnostica de los antígenos como el antígeno 5 y el B (Shepherd y McManus, 1987). En el presente apartado comparamos la sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA usando diferentes preparaciones

de líquido hidatídico, y mediante inmunoblot describimos el valor diagnóstico de la composición antigénica en función del modo en que el antígeno fué preparado.

Los diferentes polipéptidos presentes en el líquido hidatídico fueron purificados, siguiendo el método tradicionalmente utilizado para obtener la fracción enriquecida en antígenos 5 y B (Oriol y col., 1971), y se comparó con preparaciones obtenidos mediante cromatografía a través de ConA-Sepharosa.

La hidatidosis crónica da lugar a una reacción humoral intensa, y a la aparición de anticuerpos específicos en el suero de los pacientes afectados (Matossian y col., 1972; 1976). El diagnóstico inmunológico de esta enfermedad se lleva a cabo el líquido hidatídico obtenido generalmente de ovejas infectados, ya que suele ser el más disponible en los países donde la hidatidosis es frecuente. Además de las diferencias tanto cualitativas como cuantitativas entre antígenos procedentes de diferentes hospedadores (Janssen y col., 1990; Verastegui y col., 1992), las diferentes sensibilidades y especificidades documentadas al comparar ensayos de ELISA y Western Blot sugieren que la preparación de antígenos es igualmente crucial. Este punto es evidente, en el presente trabajo, al comparar los sueros de pacientes con hidatidosis con los procedentes de donantes sanos o de otras infecciones parasitarias, mediante ELISA (Tabla.1). Cuando usamos el Líquido hidatídico completo o el homogenado de protoescólices, se observan falsos positivos en sueros de pacientes con cisticercosis (*Taenia solium*), toxoplasmosis ó leishmaniosis. El mínimo de falsos positivos disminuye cuando el antígeno lo compone la fracción enriquecida en antígeno B y 5, o la fracción obtenida mediante cromatografía a través ConA-sepharosa (Tabla.1,3). El estudio confirma que la técnica de ELISA carece de especificidad cuando se usa el líquido hidatídico total como fuente de antígeno (Kanwar y col., 1992; Verastegui y col., 1992), donde se demuestra una elevada reactividad cruzada con la cisticercosis, y que esta especificidad aumenta cuando el antígeno es parcialmente purificado (Barbieri y col.,

1993; Rogan y col., 1991).

Las diferencias obtenidas en ELISA al usar HF, PS, o los antígenos purificados se entienden mejor cuando se observan los resultados obtenidos mediante la inmunotransferencia. La mayoría de las preparaciones antigénicas contienen bandas de 12-14 y 20 kDa, que derivan del antígeno B. Éste también contiene un componente de 8 kDa, muy específica para la hidatidosis según algunos autores (Matossian y col., 1972; Kanwar y col., 1992) pero muestra ligeras reacciones cruzadas según otros autores (Verastegui y col., 1992; Siracusano y col., 1991). Esta banda aparentemente migra con las bandas de 12-14 kDa. También encontramos antígenos de 32 y 42 kDa, junto con una banda predominante, que probablemente deriva del antígeno 5, con un peso molecular de 37 kDa en el líquido hidatídico y en el homogenado de protoescolices.

El antígeno 5 es una lipoproteína compuesta por un complejo de 52-62 kDa que se disocia en presencia de β -mercaptoetanol dando dos subunidades de 20 y 40 kDa aproximadamente. Según Queralt y col. (1989), el antígeno 5 migra en SDS-PAGE en el área correspondiente a un peso molecular de 37 kDa bajo condiciones reductoras. Esta banda reacciona frente al suero de pacientes con hidatidosis, pero posee una especificidad baja cuando se verifica utilizando líquido hidatídico total (también puesto de manifiesto por Leggatt y col., 1992), extractos de protoescolices y la fracción glicoprotéica del líquido hidatídico (fig.2, tabla 2).

Las bandas de 12-14 y 20 kDa mostraron una elevada sensibilidad y especificidad cuando se purifican parcialmente del LH (fracción Ag5/B), pero pierden tanto la sensibilidad como la especificidad cuando usamos LH total o la fracción glicoprotéica. Leggatt y col. (1992) atribuyen una mayor sensibilidad y especificidad en la inmunodetección de la molécula de 12 kDa del antígeno B, cuando se compara con la molécula de 38 kDa del antígeno 5. Aunque la primera

muestra reactividad cruzada con *E. multilocularis* (40%) y en menor medida con *T. solium* (5,5%), las diferencias en su valor diagnóstico fueron obtenidas cuando se llevo a cabo el inmunoblotting utilizando antígenos semipurificados en vez de LH, como se deduce de la tabla 2.

Las diferentes preparaciones antigénicas procedentes del LH, cuando se comparan mediante inmunotransferencia, muestran esas subunidades como aquellas derivadas del antígeno B, con idéntica movilidad electroforética, y presentan diferente reactividad inmunológica con respecto a su sensibilidad y especificidad. Además, sospechamos que la purificación de antígenos puede provocar un cambio en la movilidad electroforética de los mismos.

Verificamos la importancia de la purificación de los antígenos B y 5 del líquido hidatídico para reducir las reacciones cruzadas. Esto se demostró igualmente con la banda de 42 kDa, presente en todas las preparaciones antigénicas, pero resultó ser más sensible y específica cuando fue purificada del LH mediante cromatografía a través de ConA-sepharosa (tabla 3). Los resultados confirman la necesidad de encontrar formas de exponer los epítopes específicos de antígenos conocidos. En vista de los resultados obtenidos, las técnicas de biología molecular pueden ser de gran valor para obtener antígenos de *E. granulosus* modificados en la polaridad o conformación de sus epítopes, en su esfuerzo para mejorar el inmunodiagnóstico de la hidatidosis.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA.

Abril, M.J. and Guisantes, J.A. (1988) Total and specific IgE levels in human hydatid disease determined by enzymeimmunoassay. I. Preoperative levels. *Allergol Immunopath.* 16: 49-52.

Aceti, A., Celestino, D., Teggi, A. and Caferro, M. (1992) Spontaneous in vitro generation of histamine releasing factor from mononuclear cells of patients with hydatidosis. *Int. Arch. Allerg. and Applied Immunol.* 98: 247-251.

Al Yaman, F.M. and Knobloch, J. (1989) Isolation and partial characterization of Species-specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* cyst fluid. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37: 101-107.

Agmelio, F., Saba, F., Bitti, A. et al. (1987) Antibody reactivity to HLA classes I and II in sera from patients with hydatidosis. *J. Infec. Dis.* 156: 673-676. Ref-Ref.

Ali-Khan, Z., Siboo, R., Gomersall, M. and Faucher, M. (1983) Cystolytic events and possible role of germinal cells in metastasis in chronic alveolar hydatidosis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 77: 497-512.

Andrews, A.T. (1986). en *Electrophoresis, Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications*, pp. 241-288, (2nd edition) Clarendon Press, Oxford.

Bähr, R. (1981) *Die Echiookokose des Menschen*. Stuttgart: Enke Verlag.

Barbieri, M., Sterla, S., Battistoni, J. and Nieto, A. (1993) High performance latex reagent for hydatid serology using an *Echinococcus granulosus* lipoprotein antigen fraction purified from cyst fluid in one step. *Int. J. Parasitol.* 23(5): 565-572.

Baron, R.W. and Tanner, C.E. (1977) *Echinococcus multilocularis* in the mouse: the "in vitro" protoscolicidal activity of peritoneal macrofages. *Int. J. Parasitol.* 7: 489-495.

Beggs J. (1985) The radiology of hydatid disease. *American Journal of Roentgenology, Radium Therapy and Nuclear Medicine* 145: 639- 648.

Ben Ismail, R., Rouger, P., Carme, B., Gentilini, M. and Salmon, C. (1980b) Comparative automated assay of anti-P1 antibodies in acute hepatic distomiasis (fascioliasis) and in hydatidosis. *Vox Sanguinis* 38: 165-168. ref-ref. (libro).

Ben-Ismail, R., Carme, B., Niel, G. and Gentilini, M. (1980a) Non-specific serological reactions with *Echinococcus granulosus* antigens: Role of anti-P1 antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 239-245.

Bernardini, P. and Valle, M. (1991) Complicaciones biliares de la hidatidosis hepática; problemas para el cirujano. *Archivos de la Hidatidosis* 30: 643-8.

Bonifacino, R., Craig, P., Carter, S., Malgor, R.F. and Dixon, J. (1993) Partial characterization of antigens in circulating immune complexes in cystic hydatid patients treated with albendazole. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87: 97-102.

Bouchara, J.P., Robert, R., Senet, J.M. and Leynia de la Jarrige, P. (1985) Mise en évidence de communautés antigéniques hôte-parasite dans l'hydatidose. *Bull. Soc. Path. Ex.* 78: 707-711. Ref-Ref.

Bout, D., Fruit, J. and Capron, A. (1974) Purification d'un antigène spécifique de liquide hydatidique. *Annales d'Immunologie (Institut Pasteur)* 125C: 775-788.

Calderón, C. (1977) Hidatidosis humana: evolución de tres métodos serológicos de diagnóstico. *Rev. Med. Chil.* 105: 460-463.

Cameron, G.C. and Staveley, J.M. (1957) Blood group P substance in hydatid cyst fluids. *Nature* 179: 147-148.

Cameron, T.W.M. (1960) The incidence and diagnosis of hydatid cyst in Canada. *Echinococcus granulosus* var. *Canadensis*. *Parasitology* 2: 381-390.

Capron, A., Vernes, A. and Biguet, J. (1967) Le diagnostic immunoélectrophorétique de l'hydatidose. In: *Le Kyste Hydatique du Foie*. SIMEP, Lyon, pp: 27-40.

Capron, A., Yarzabal, L., Vernes, A. and Fruit, J. (1970) Le diagnostic immunologique de l'échinococcose humaine. *Pathologie Biologie* 18: 357-365.

Caremani, M. y col. (1991) Detection of hydatid cysts with echography: survey on 249.299 patients. *Archivos de la Hidatidosis* 30: 277-307.

Cesbron, J.Y., Capron, M. and Capron, A. (1986) Le diagnostic immunologique de l'hydatidose humaine. *Gastroenterol. Clin. biol.* 10: 415-418.

Coltorti, E., Guarnera, E., Larrieu, E., Santillan, G. and Aquino, A. (1988) Seroepidemiology of human hydatidosis: use of dried blood samples on filter paper. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 607-710.

Coltorti, E.A. and Varela-Díaz, V.M. (1974) Echinococcus granulosus: Penetration of macromolecules and their localization on the parasite membranes of cyst. *Exp. Parasitol.* 35: 225-231.

Coltorti, E.A. and Varela-Díaz, V.M. (1972) IgG levels and host specificity in hydatid cyst fluid. *J. Parasitol.* 58: 753-756.

Conder, G.A., Andersen, F.L. and Schantz, P.M. (1980) Immunodiagnostic tests for hydatidosis in sheep: An evaluation of double diffusion immunoelectrophoresis, indirect hemagglutination, and intradermal test. *J. Parasitol.* 66(4): 577-584.

Cox, D.A., Marshall-Clarke, S. and Dixon, J.B. (1989) Activation of normal murine B cells by Echinococcus granulosus. *Immunology* 67: 16-20.

Cox, D.A., Dixon, J.B., Marshall-Clarke, S. (1986) Transformation induced by Echinococcus granulosus protoscoleces in unprimed murine spleen cells. Identity and MHC restriction of participating cell types. *Immunology* 57: 461.

Craig, P.S., Zeyhle, E. and Romig, T. (1986) Hydatid disease: research and control in Turkana. II. The role of immunological technique for the diagnosis of hydatid disease. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80: 183-192.

Craig, P.S., Mitchell, G.F., Cruise, K.M. and Rickard, M.D. (1980) Hybridoma antibody immunoassays for the detection of parasitic infection: attempts to produce an immunodiagnostic reagent for a larval taenid cestode infection. *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.* 58: 339-350.

Craig, P.S. (1986) Detection of specific circulating antigen, immune complexes and antibodies in human hydatidosis from Turkana (Kenya) and Great Britain, by enzyme-immunoassay. *Parasite Immunol.* 8: 171-188.

Craig, P.S. and Rickard, M.D. (1981) Studies on the specific immunodiagnosis of larval cestode infections of cattle and sheep using antigens purified by affinity chromatography in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Int. J. Parasitol.* 11: 441-449.

Craig, P.S. and Nelson, G.S. (1984) The detection of circulating antigen in human hydatid disease. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78: 219-227.

Creighton, W.D., Lambert, P.H. and Miescher P.A. (1973). Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with

polyethylene glycol. *J. Immunol.* 111: 1219-1227.

Cuatrecasas, P. and Anfisen, C.B. (1971) *Ann. Rev. Biochem.*, 40:259 (1971).
Affinity chromatography.

Cuatrecasas, P. (1972) Affinity chromatography of Macromolecules. en
Advances in Enzymology. Vol 36 (A.Meister, Ed), New York, p.29.

Chamekh, M., Facon, B., Dissous, C., Haque, A. and Capron, A. (1990) Use
of a monoclonal antibody specific for a protein epitope of *Echinococcus granulosus*
antigen 5 in a competitive antibody radioimmunoassay for diagnosis of hydatid
disease. *Journal of Immunological Methods* 134: 129-137.

Chamekh, M., Gras Masse, H., Bossus, M., Facon, B., Dissous, C., Tartar,
A. and Capron, A. (1992) Diagnostic value of a synthetic peptide derived from
Echinococcus granulosus recombinant protein. *J. Clin. Investigations* 89: 458-564.

Matossian, R.M., Kane, G.L., Chantler, S.M., Batty, I. and Sarhadian, H.
(1972) The specific immunoglobulin in hydatid disease. *Immunology* 22: 423-430.

Chemtai, A.K., Okelo, G.B. and Kyobe, J. (1981) Application of immuno-
electrophoresis (IEP5) test in the diagnosis of human hydatid disease in Kenya. *East
African Medical Journal* 58: 583-586.

Chordi, A. and Kagan, I.G. (1965) Identification and characterization of
antigenic components of sheep hydatid cyst fluid by immunoelectrophoresis. *J.
Parasitol.* 51: 63-71.

D'Amelio, R., Pontesilli, O., Dayal, R., De Rosa, F., Barnet, M., Teggi, A.,
Brighthouse, G. and Lambert, P.H. (1985) Characterization of parasite antigens from
human hydatid cyst fluid by SDS-PAGE and IEF. *Med. Microbiol. Immunol.* 174:
43-50.

D'Amelio, R., De Rosa, F., Pontesillo, O., Rayal, R., Brighthouse, G., Teggi,
A., Barnet, M. and Lambert, P.H. (1989) Hydatid disease: analysis of parasite
antigens in circulating immune complexes and in performed hydatid antigen-antibody
complexes. *Med. Microbiol. Immunol.* 178: 177-186.

Danis, M., Bröker, G., Gentilini, M., Richar-Lenoble, D. and Smith, M.
(1977) Treatment of hepatic hydatid disease. *Br. Med. J.* 2: 1356.

Dessaint, J.P., Bout, D., Watre, P. and Capron, A. (1975) Quantitative
determination of specific IgE antibodies to *Echinococcus granulosus* and IgE levels

in sera from patients with hydatid disease. *Immunology* 29: 813-822.

Dévé, F. (1949) *L'echinococcose primitive*. Paris: Masson.

Di Felice, G. and Siracusano, A. (1987) Monoclonal antibodies for immunodiagnosis of human hydatidosis. *Parasitology Today*. 3: 25-26.

Di Felice, G., Pini, C., Afferni, C. and Vicari, G. (1986) Purification and partial characterization of the major antigen of *Echinococcus granulosus* (antigen 5) with monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20: 133-142.

Dottorini, S. and Tassi, C. (1977) *Echinococcus granulosus*: characterization of the main antigenic component (arc 5) of hydatid fluid. *Experimental Parasitology* 43: 307-314.

Dottorini, S. and Tassi, C. (1978) *Echinococcus granulosus*: comparison between antigens in scolices and hydatid fluid. *Int. J. Parasitol.* 8: 259-265.

Duran, H., Fernandez, L., Gomez-Castesana, L., Lopez-Duran, L., Mata, P., Brandau, D. and Sanchez-Barba, A. (1978) Osseous hydatidosis. *J. Bone. Joint. Surg.* 60: 685-690.

Eckert, J. (1986) Prospects for treatment of the metacestode stage of *Echinococcus*. In: Thompson R.C.A (ed.), *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*. George Allen and Unwin, London, pp: 250-84.

Falagiani, P., Carluccio, A., Tiddia, E., Pio, G. (1979) Valore diagnostico del RAST nella echinococcosis rispetto ai tests tradizionali: Prospettive per un suo inserimento nella medicina preventiva in Sardegna. *Folia. Allergol. Immunol. Clini.* 26: 243-248.

Faulk, W.P. and Taylor, G.M. (1971) An immunocloidal method for the electron microscope. *Immunochemistry* 8: 1081-1083.

Ferreira, H.B. and Arnaldo Zaha. (1990) Analysis of different antigen sources in the diagnosis of human hydatid disease by immunoblot. *Basic Research in Helminthiases*, Edited by R. Ehrlich, A. Nieto and L. Yarzabal. pp: 189-201.

Findlay, J.B.C. (1986) *Biological membranes. A practical approach. Isolation and labeling of proteins and peptides*. IRL Press. Lim. P.O. Box 1, Eynsham, Oxford OX8 1 JJ, England.

Frey, M.D., et al. (1986) Preparation of rehydratable polyacrylamide gels and

their application in ultrathin-layer isoelectric focusing. *Electrophoresis*. 7, 28-40.

Gallardo, M.P. and Bereciartua, E.Q. (1991) Indicadores humanos en las evaluaciones de los programas de control en la hidatidosis. *Archivos de la Hidatidosis* 30: 99-105.

Gottstein, B. (1984) An immunoassay for the detection of circulating antigens in human echinococcosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33: 1185-1191.

Gottstein, B. (1992) Molecular and immunological diagnosis of Echinococcosis. *Clinical Microbiology Reviews* 5: 248-261.

Gottstein, B., Schantz, P.M., Toderov, T., Saimot, A.G. and Jacquier, P. (1986) An international study on the serological differential diagnosis of human cystic and alveolar echinococcosis. *Bulletin of the World Health Organization* 64: 101-105.

Gottstein, B., Eckert, J. and Fey, H. (1983) Serological differentiation between *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis* infections in man. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 69: 347-356.

Gottstein, B., Eckert, J., Michael, S.A. and Thompson, R.C.A. (1987) *Echinococcus granulosus*: immunoelectrophoresis and western blot analysis of hydatid cyst fluids. *Parasitology research* 73: 186-189.

Haertel, M., Fretz, Ch. and Fuchs, W. (1980) Zur Computertomographischen Diagnostik der Echinokokkose. *Fortschritte auf dem Gebiete der Roentgenstrahlen und der Nuklearmedizin* 133: 164-70.

Hamel, K.L. and Ris, D.R. (1982) The use of a Cathodic antigen in the immunoelectrophoretic serodiagnosis of *Echinococcus granulosus* in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 3: 419-425.

Hariri, M.N., Schwabe, C.W. and Koussa, M. (1965) Host-parasite relationships in echinococcosis XI. The antigen of the indirect hemagglutination test for hydatid disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14: 592-604.

Harven, E., Leung, R., Christensen, H. (1984) A novel approach for scanning electron microscopy of colloidal gold-labelled cell surfaces. *J. Cell. Biol.* 99: 53-57.

Heath, D.D. (1970) The development of *Echinococcus granulosus* larvae in laboratory animals. *Parasitology* 60: 449-456.

- Heath, D.D. and Osborn, J. (1976) Formation of *Echinococcus granulosus* laminated membrane in a defined medium. *Int. J. Parasitol.* 6: 467-471.
- Heukeshoven, J., DernicK, R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6, 103-112.
- Hugier, M., Leynadier, F., Houry, S., Lacaine, F., Dry, J. (1987) Human basophil degranulation test in liver hydatidosis. *Dig. Dis. Sci.* 32: 1354-7.
- Huldt, G., Johanson, G.S.O. and Lanttos, S. (1973) Echinococcosis in northern Scandinavia. *Archives of Environmental Health* 26: 35-40.
- Iacona, A., Pini, C. and Vicari, G. (1980) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the serodiagnosis of hydatid disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 95-102.
- Jägerstern, C., Edström, A. (1987) 2-D electrophoresis in small gels. *J. Biochem. Biophys. methods.* 14, suppl. p. 44.
- Jerray, M., Benzarti, M., Garrouche, A., Klabi, N. and Hayouni, A. (1992) Hydatid disease of the lungs. Study of 286 cases. *American Review of Respiratory Disease* 156: 185-9.
- Jones, W.H. (1948) *Hipocrates*, Vol. 4, Aphorisms, Section 7, 55. Cambridge: Harvard University Press.
- Judson, D.G., Dixon, J.B., Clarkson, M.J., and Pritchard, J. (1985) Ovine hydatidosis: some immunological characteristics of the seronegative host. *Parasitology* 91: 349-357.
- Kagan, I.G. and Norman, L. (1963) Analysis of helminth antigens (*Echinococcus granulosus* and *Schistosoma mansoni*) by agar gel methods. *Annals of the New York Academy of Science.* 113: 130-153.
- Kagan, I.G. and Norman, L. (1961). Antigenic analysis of *Echinococcus* antigen by diffusion techniques. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 10: 727-734.
- Kagan, I.G., Osimani, J.J., Valera, J.C. and Allain, D.J. (1966) Evolution of intradermal and serologic test for the diagnosis of hydatid disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 10: 727-732.
- Kanwar, J.R. and Vinayak, V.K. (1993) Isolation and immunochemical

characterization of diagnostically relevant antigens of *Echinococcus granulosus*. *Indian. J. Med. Res.* 97: 75-82.

Kanwar, J.R. and Vinayak, V.K. (1992) The significance of free and immune-complexed hydatid specific antigen(s) as immunodiagnostic tool for human hydatidosis. *J. Med. Microbiol.* 37: 396-403.

Kanwar, J.R., Kaushik, S.P., Sawhney, I.M.S., Kamboj, M.S., Mehta, S.K. and Vinayak, V.K. (1992) Specific antibodies in serum of patients with hydatidosis recognised by immunoblotting. *J. Med. Microbiol.* 36: 46-51.

Larrand, L., Benito, R., Sarria, A. y col. (1984) Postoperative control for the persistence of positivity in three immunological tests used in the diagnosis of hydatidosis in children (ELISA-Specific IgE, Indirect Hemagglutination and ELISA-Total IgE). *Allergol Immunopathol.* 12: 199-206.

Knecht, E., Martínez-Ramón, A. and Grisolia, S. (1986) Electron microscopic localization of glutamate dehydrogenase in rat liver mitochondria by an immunogold procedure and monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 34: 913-922. ref-ref. (Durfort, M., Vilaró, S., Renau, J. and Serratos, J. (1991) Técnicas de Inmunocitoquímica en Microscopia Electrónica. pp, 164-165).

Kroeze, E. and Tanner, C.E. (1987). *E. multilocularis*: susceptibility and responses to infection in immunized mice. *Int. J. Parasitol.* 170: 873-883.

Kumaratilake, L.M. and Thompson, R.C.A. (1982) Hydatidosis/echinococcosis in Australia. *Helminthol. Abs. Series A. Animal and Human Helminthology* 51: 233-252.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.

Ornstein, L. (1964). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 321-345.

Lauriola, L., Piantelli, M., Pozzuoli, R., Arru, E. and Musiani, P. (1978) *Echinococcus granulosus*: preparation of monospecific antisera against antigens in sheep hydatid fluid. *Zentralblatt fuer Bakteriologie I Abt Originale A* 240: 251-257. Ref-Ref (libro).

Leggatt, G.R. and McManus, D.P. (1994) Identification and diagnostic value of a major antibody epitope on the 12 kDa antigen from *Echinococcus granulosus* (Hydatid disease) cyst fluid. *Parasite Immunol.* 16: 87-96.

Leggatt, G.R., Yang, W. and McManus, D.P. (1992) Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in *Echinococcus granulosus* cyst fluid by immunoblot analysis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 66: 189-192.

Leslie Hudson, Frank C.Hay. (1989). *Practical Immunology*, Third Edition, p: 4.

Lethbridge, R.C. (1980) The biology of the oncosphere of cuclophyllidean cestodes. *Helminthol. Abstr. A.* 49: 59-72.

Lewall, D.B., Scott, J. and McCorkell, S.J. (1985) Hepatic echinococcal cyst: Sonographic appearance and classification. *Radiology* 155: 773-775.

Leynadier, F., Luce, H., Abrego, A., Hugiex, M., Dry, J. and Huguet, C. (1980) Human basophil degranulation test in diagnosis of hydatidosis. *Br. Med. J.* 280: 1251-2.

Lightowers, M.W., Liu, D.Y., Haralambous, A. and Rickard, M.D. (1989b) Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37: 171-182.

Lightowers, M.W., Rickard, M.D., Horney, R.D., Obendorf, D.L. and Mitchell, G.F. (1984) Serological diagnosis of *Echinococcus* infection in sheep using cust fluid antigen processed by antibody affinity chromatography. *Australian Veterinary Journal* 61:101-108.

Liu, D., Rickard, M.D. and Lightowers, M.W. (1992c) Further characterization of monoclonal antibodies to *Echinococcus granulosus* antigen 5 and antigen B. *Int. J. Parasitol.* 22: 391-394.

Liu, D., Rickard, M.D. and Lightowers, M.W. (1992b) A strategy for production of monoclonal antibodies to *Echinococcus granulosus* antigen 5 and antigen B. *Int. J. Parasitol.* 22: 1013-1016.

Liu, D., Lightowers, M.W. and Rickard, M.D. (1992a) Evaluation of a monoclonal antibody- based competition ELISA for the diagnosis of human hydatidosis. *Parasitology* 104: 357-361.

Liu, D., Rickard, M.D. and Lightowers, M.W. (1993) Assessment of monoclonal antibodies to *Echinococcus granulosus* Antigen 5 and Antigen B for detection of human hydatid circulating antigens. *Parasitology* 106: 75-81.

Lopera, R.D., Melendez, R.D., Fernandez, I., Sirit, J., Ferera, M.P. (1989)

Orbital hydatid cyst of *E. oligarthus* in a human in Venezuela. *J. Parasitol.* 75 (3): 467-470.

Löscher, T., von Sonnenburg, F. and Nothdurft, H.D. (1992) Epidemiology and therapy of human echinococcosis in central Europe. 8th International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Pattaya, Thailand, p. 342.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.S. y Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275. Protein measurement with the Folin phenol reagent.

Lymbery, A.J. and Thompson, R.C. (1989) Genetic differences between cysts of *Echinococcus granulosus* from the same host. *Int. J. Parasitology* 19: 961-964.

Macpherson, C.N., Romig, T., Zeyhle, E., Rees, P.H. and Were, J.B. (1987) Portabel ultrasound scanner versus serology in screening for hydatid cysts in a nomadic population. *Lancet* ii, 259-261.

Maddison, S.E., Slemenda, S.B., Schantz, P.M., Fried, J.A., Wilson, M. and Tsang, V.C. (1989) A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40: 377-383.

Maher, K.M., Kaddah, M.A., Hassanein, H.I., Shaker, Z.A. and Khalafallah, A.M. (1992) Identification and characterization of specific hydatid antigen fraction(s). *J. Egyptian Soc. Parasitol.* 22: 511-520.

March, F., Enrich, C., Mercader, M., Sánchez, F., Muñoz, C., Coll, P. and Prats, G. (1991) *Echinococcus granulosus*: antigen characterization by chemical treatment and enzymatic deglycosylation. *Experimental Parasitology.* 73: 433-439.

Mate, T. (1991) Programa de control de hidatidosis- indicadores (España). *Archivos de la hidatidosis* 30: 85-98.

Matossian, R.M., McLaren, M.L., Drapper, C.C. et al. (1979) The serodiagnosis of human hydatid disease: 2. Additional studies on selected sera using indirect haemagglutination (IHA), enzyme-Linked-Immuno-Sorbent Assay (ELISA) and defined antigen substrate spheres (DASS). *J. Helminthol.* 53: 287-291.

Matossian, R.M., Rickard, M.D., Smyth J.D. (1977) Hydatidosis: A global problem of increasing importance. *Bull WHO*, 55: 499-507.

Mentha, G., Morel, Ph.B.L., Huber, O., Klopfenstein, C.E. and Rohner, A. (1991) Traitement chirurgical de l'hydatidose hépatique. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 121: 1231-7.

Moro, P.L., Gilman, R.H., Wilson, M., Schantz, P.M., Verategui, M., Garcia, H.H. and Miranda, E. (1992) Immunoblot (Western blot) and double diffusion (DD5) tests for hydatid disease cross-react with sera from patients with cysticercosis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86: 422-423.

Morris, D.L. and Richards, K.S. (1992) Hydatid disease. *Current Medical and Surgical Management*. Butterword - Heinemann Ltd, Oxford.

Nemazee, D.A. (1985) Immune complexes Can trigger specific, T-cell Dependent, Auto Anti-IgG antibody production in mice. *J. Exp. Med.* 161: 242-249.

Nemazee, D.A. and Sato, V.I. (1983) Induction of rheumatoid antibodies in mouse regulated production of autoantibody in secondary humoral response. *J. Exp. Med.* 158: 524.

Norman, L., Kagan, I.G. and Chordi, A. (1964) Further studies on the analysis of sheep hydatid cyst fluid by agar gel methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13: 816-821.

Oriol, R., Williams, J.R., Perez Esandi, M.V. and Oriol, C. (1971) Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20: 569-574.

Oriol, R., Williams, J.F., Perez-Esandi, M.V. and Oriol, C. (1971). Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hidatid fluid. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 20, 569-574.

Oriol, C. and Oriol, R. (1975) Physicochemical properties of a lipoprotein antigen of *Echinococcus granulosus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24: 96-100.

Paganelli, R., Levinsky, R.J., Atherton, D.J. (1981). Detection of specific antigen within circulating immune complexes. Validation of the assay and its application of food antigen-antibody complexes formed in healthy and food allergic subjects. *Clin. Exp. Immunol* 46: 44-53.

Pezzela, M., Galli, C., Vullo, V., Zennaro, F., Delia, S. and Sorice, F. (1984) *Echinococcus granulosus* antigens: comparative analysis of human, bovine and ovine hydatid fluids. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78 (5): 549-551.

Pezzela, M., Galli, C., Delia, S. et al. (1984a) Fractionation and characterization of hydatid fluid antigens with identification of an antigen similar to human serum albumin. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78: 821-826. Ref-Ref.

Piantelli, M., Pozzuoli, R., Arru, E., and Musiani, P. (1977) Echinococcus granulosus: identification of subunits of the major antigens. *J. Immunol.* 119: 1382-1386.

Pini, C., Pastore, R. and Valesini, G. (1983) Circulating immune complexes in sera of patients infected with Echinococcus granulosus. *Clin. Exp. Immunol.* 51: 572-578.

Pinon, J.M., Poirriez, J. Lapan, H., Geers, R., Penna, R. and Fernandez. (1987) Value of isotypic characterization of antibodies to Echinococcus granulosus by enzyme-linked immuno-filtration assay. *Europ. J. Clin. Microbiol.* 6: 291-295. Ref-ref (libro).

Pozzuoli, R., Piantelli, M., Perucci, C., Arru, E. and Musiani, P. (1975) Isolation of the most immunoreactive antigens of Echinococcus granulosus from a sheep hydatid fluid. *J. Immunol.* 115: 1459-1463.

Pozzuoli, R., Musiani, P., Arru, E., Piantelli, M. and Mazzarella, R. (1972) Echinococcus granulosus: isolation and characterization of sheep hydatid fluid antigens. *Experimental Parasitology* 32: 45-55.

Queralt, R., Mádico, A., Mercader, M., Pardo, A., Sánchez, F., March, F., Coll, P., and Muñoz, C. (1989) Purification de antígenos parasitarios a partir de líquido hidatídico. Estudio de su reactividad por "Immunoblot". *Rev. Ibér. Parasitol.* 49(4): 313-319.

Reeder, M.M. and Palmer, P.E.S. (1981) *The Radiology of Tropical Diseases with Epidemiological, Pathological and Clinical Correlation.* Williams and Wilkins, Baltimore.

Rickard, M.D., Honey, R.D., Brumley, J.L. and Mitchell, G.F. (1984) Serological diagnosis and post-operative surveillance of human hydatid disease. II. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using various antigens. *Pathology* 16: 211-215.

Richard-lenoble, D., Smith, M.D., Loiuy, M. and Verdoust, P.J. (1978) Human hydatidosis: Evaluation of three serodiagnostic methods, the principal subclass of specific immunoglobulin and the detection of circulating immune complexes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 72: 553-560.

Rishi, A.K. and McManus, D.P. (1987) Genomic cloning of human Echinococcus granulosus DNA: isolation of recombinant plasmids and their use as genetic markers in strain characterization. *Parasitology* 94: 369-383.

Yap, K.W., Thompson, R.C. and Pawlowski, I.D. (1988) The development of nonradioactive total genomic probes for strain and egg differentiation in taeniid cestodes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39: 472-477.

Rogan, M.T., Morris, D.L., Pritchard, D.I. and Perkins, A.C. (1990). *Echinococcus granulosus*: The potential use of specific radiolabelled antibodies in diagnosis by immunoscintigraphy. *Clinical and Experimental Immunology*, 80, 225-231.

Rogan, M.T., Craig, P.S., Zeyhle, E., Rmig, T., Lubano, G.M. and Deshan, Liu. (1991) Evaluation of a dot-ELISA as a field test for the diagnosis of cystic hydatid disease. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85: 773-777.

Russi, S., Siracusano, A. and Vicari, G. (1974) Isolation and characterization of a blood P1 active carbohydrate antigen of *Echinococcus granulosus* cyst membrane. *J. Immunol.* 112: 1061-1069.

Sacdpraseuth, J.S., Meunier, J. and Spagnol, F. (1981) Application du test de degranulation des basophiles humains au diagnostic de l'hydatidose. *Lyon Medical* 245: 141-146. ref-ref (libro).

Saimont, A.G., Cremieux, J., Hay, M., Meulemans, A., Giovanangeli, M.D., Delaitre, B. and Couland, J.P. (1983) Albendazole as a potential treatment for human hydatidosis. *Lancet* ii. 652-656.

Schantz, P.M. and Gottstein, B. (1986) *Echinococcus* (hydatidosis). In: Walls, K.W. and Schantz, P.M. (eds), *Immunologic Investigation of Tropical Parasitic Disease*, Vol.1. Academic Press, Orlando, pp. 69-107. ref-ref (libro).

Schantz, P.M., Shanks, D. and Wilson, M. (1980) Serologic cross-reactions with sera from patients with echinococcosis and cysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 609-612.

Schantz, P.M. (1972) Localización de la hidatidosis en el sistema nervioso central. *Bol. Ofic. Sant. Panamericano* 63: 198-202. ref-ref. (libro).

Schantz, P.M. (1983) Human behavior nad parasitic zoonoses in North America. *Human Ecology and Infections Diseases*. Reprinted by the U.S. Departement of Health and Human Services. Public Health Service.

Schleif, F. Robert and Wensink, C. Pieter. (1981) *Practical Methods in Molecular Biology*.

Shepherd, J.C. and McManus, D.P. (1987) Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25: 143-154.

Siracusano, A., Teggi, A., Quinteri, F., Notargiacomo, S., De Rosa, F. and Vicari, G. (1988) Cellular immune responses of hydatid patients to *E. granulosus* antigen. *Clin. Exp. Immunol.* 27: 400-405.

Siracusano, A., Ioppolo, S., Notargiacomo, S., Ortona, E., Riganó, R., Teggi, A., De Rosa, F. and Vicari, G. (1991) Detection of antibodies against *Echinococcus granulosus* major antigens and their subunits by immunoblotting. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85: 239-243.

Smyth, J.D. (1979) An in vitro approach to taxonomic problems in trematodes and cestodes, specially *Echinococcus*. 17th Symp. *Brit. Soc. Parasitol.*

Swiderski, Z. (1982) *Echinococcus granulosus*: embryonic envelope formation. *Pro. 10 Th Int. Cong. Electron Microscopy* 3: 513.

Tassi, C., Baldeelli, F., Papilli, R. and Valigli, R. (1984) Specific IgM antibody response, evaluated by micro-ELISA, to various antigen fractions from sheep hydatid fluid and scolices of *Echinococcus granulosus*, in sera from patients affected by hydatid disease, before and after surgery. *Boll Ist Sieroter Milan* 63 (2): 140-144.

Tassi, C., Dottorini, S., Scalise, G. and Geranio, N. (1981) *Echinococcus granulosus*: Diagnosis of human hydatid disease by the indirect hemagglutination reaction with antigens from hydatid fluid and scolices. *Int. J. Parasitol.* 11: 85-88.

Thompson, R.C.A. (1977) Hydatidosis in Great Britain. *Helminthol. Abs. Series A* 46: 837-861.

Thompson, R.C.A. and Smyth, J.D. (1975) Equine hydatidosis: a review of the current status in Great Britain and the results of an epidemiological survey. *Vet. Parasitol.* 1: 107-127.

Thompson, R.C.A., Houghton, A. and Zaman, V. (1982) A study of the microtriches of adult *Echinococcus granulosus* by scanning electron microscopy. *Inter. J. Parasitol.* 12: 579-583.

Varela-Díaz, V.M., Coltorti, E.A., Prezioso, V., López-Lemes, M.H., Guisantes, J.A. and Yarzabal, L.A. (1975) Evaluation of three immunodiagnostic tests for human hydatid disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24: 312-319.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.

Varela-Díaz, V.M., Coltorti, E.A. and D'Alessandro, A. (1978) Immunoelectrophoresis tests showing *Echinococcus granulosus* arc 5 in human cases of *Echinococcus vogeli* and Cysticercosis-multiple myeloma. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 554-557.

Varela-Díaz, V.M., Coltorti, E.A., Ricardes, M.I., Guisantes, J.A. and Yarzabal, L.A. (1974) The immunoelectrophoretic characterization of sheep hydatid cyst fluid antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23: 1092-1096.

Varela-Díaz, V.M. and coltorti, E.A. (1976) Techniques for the Immunodiagnosis of human hydatid disease. Pan American Zoonosis, Buenos Aires. ref-ref (libro).

Verastegui, M., Moro, P., Guevara, A., Rodriguez, T., Miranda, E. and Gilman, R.H. (1992) Enzyme-Linked Immunoelectrotransfer Blot Test for Diagnosis of Human Hydatid Disease. *J. Clin. Microbiol.* June: 1557-1561.

Vialtel, P., Chenals, F., Desgeorges, P., Couderc, P., Miquin, C. and Cordonnier, D. (1981) Membranous nephropathy associated with hydatid disease. *N. Engl. J. Med.* 304: 610-611. Ref-Ref.

Von Sinner, W.N. (1990) Ultrasound, CT and MRI of ruptured and disseminated hydatid cyst. *European Journal of Radiology* 11: 31-37.

Von Sinner, W.N. (1991) New diagnostic signs in hydatid disease: radiology, ultrasound, Ct and MRI correlated to pathology. *European Journal of Radiology* 12: 150-159.

Wachira, T.M., Macpherson, C.N.L. and Gathuma, J.M. (1991) Release and survival of *Echinococcus* eggs in different environments in Turkana and their possible impact on the incidence of hydatidosis in man and liverstock. *Journal of Helminthology* 65: 55-61.

Wardle, R.A., Mcleod, J.A. and Radino wsky. (1974) Advances in the zoology of tapeworms. Mineapolis: University of Minesoata Press.

Wattal, C., Mohan, C. and Agarwal, S.C. (1988) Evaluation of specific immunoglobulin E by enzyme-linked immunosorbent assay in hydatid disease. *Int. Arch. Allerg. and Applied Immunol.* 87: 98-100. ref-ref (libro).

WHO (1992) Report of the WHO Working Group Meeting on Clinical Medicine and Chemotherapy of Alveolar and Cystic Echinococcosis. (WHO/CDS/VPH. 93.118). World Health Organization, Geneva.

Williams, K.W., Söderberg, L. (1979) A carrier ampholyte for isoelectric focusing. International laboratory, Jan/Feb.

Williams, J.F., Perz-Esandi, M.V. and Oriol, R. (1971). Evaluation of purified lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* in the immunodiagnosis of human infection. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 20, 575-582.

Wyckoff, M., et al. (1977). Polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-containing buffers using multiphasic buffer systems: Properties of the stack, valid Rf-measurements, and optimized procedure. Ann. Biochem. 78, 459-482.

Yarzabal, L.A., Bout, D.T., Naquira, F.R. and Capron, A.R. (1977) Further observations on the specificity of antigen 5 of *Echinococcus granulosus*. J. Parasitol. 63: 495-499.

Yong, W.K. and Heath, D.D. (1979) Arc 5 antibodies in sera of sheep infected with *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *Taenia ovis*. Parasite Immunology 1: 27-38.

Zhanqing, S.H., Xinhua, F., Zhongxi, Q., Ruilin, L. and Chunrong, Y. (1988) Applications of biotin-avidin system, determination of circulating immune complexes, and evaluation of antibody response in different hydatid patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. 39: 93-96.