

**UNIVERSIDAD
AUTONOMA DE BARCELONA**

Departamento de Genética y Microbiología
FACULTAD DE MEDICINA
(Unidad Docente *Sant Pau*)

**CARACTERIZACION,
PURIFICACION
Y LOCALIZACION
INMUNOHISTOQUIMICA
DE LOS
ANTIGENOS MAYORITARIOS
DE
Echinococcus granulosus
ANTIGENO 5 Y ANTIGENO B**

Tesis que para optar al Grado de Doctor presenta

Fernando Sánchez Reus

Bajo la dirección de

Dra. Dña. Carmen Muñoz Batet
Profesor Asociado de Microbiología y Parasitología Médica
Departamento de Genética y Microbiología
Facultad de Medicina
(Unidad Docente de *Sant Pau*)
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA

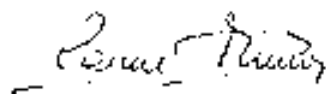
Barcelona, Marzo de 1992

Carmen Muñoz Batet, Profesor Asociado de Microbiología y Parasitología Médicas, Facultad de Medicina (Unidad Docente Sant Pau), del Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona.

CERTIFICA:

Que el trabajo: "Caracterización, purificación y localización inmunohistoquímica de los antígenos mayoritarios de Echinococcus granulosus: antígeno 5 y antígeno B", realizado por el licenciado en Medicina y Cirugía Fernando Sánchez Reus, lo ha sido bajo su dirección, y considera apto de ser leído y defendido ante un tribunal calificador, para la obtención del Grado de Doctor.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Barcelona a treinta de Marzo de mil novecientos noventa y dos.



Prof. Carmen Muñoz Batet



La parte experimental de la Tesis presentada ha sido realizada en los siguientes centros:

- Servicio de Microbiología del *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau* de Barcelona.

- Unidad de Biología Celular del Departamento de Bioquímica y Fisiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.

Parte de la misma ha podido realizarse gracias a la concesión de dos Becas de Ayuda a la Investigación por el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, Instituto Nacional de la Salud (expedientes: 88/1303-89/0021 y 91/0389).

A TERESA PER EL SEU SUPORT
I A L'ADRIÀ QUE HA CRESCUT
PARELL A AQUESTA TESIS

La memoria que se expone a continuación es el fruto de varios años de trabajo durante los cuales se ha recibido la ayuda y colaboración de numerosas personas y centros de investigación, sin los cuales, hubiera sido imposible llevar a término dicho estudio. Es por ello que quiero expresar mi agradecimiento a todos aquellos que con su contribución y aportaciones han permitido la elaboración de la presente Tesis Doctoral.

En primer lugar quiero expresar mi mas profunda gratitud a la Dra. Carmen Muñoz i Batet, facultativa adjunto del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y Profesor Asociado de Microbiología y Parasitología Médicas del Departamento de Genética y Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, por haber aceptado la dirección de este trabajo y porque su orientación, consejo, y amistad, mostrada desde el inicio del mismo ha significado para mi una ayuda y estímulo constante haciendo posible su ejecución.

Hago igualmente extensible mi agradecimiento al Dr. Guillermo Prats i Pastor, Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y Catedrático de Microbiología y Parasitología Médicas del Departamento de Genética y Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, por haber aceptado el desarrollo de la presente Tesis Doctoral en el seno del Servicio que dirige, por el gran interés que ha mostrado durante la elaboración de todo el trabajo y por proporcionar el lugar y el equipo necesarios para la investigación.

A la Dra. Montserrat Portus Vinyeta, Catedrática de Parasitología del Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. Su amplia experiencia en el mundo de la parasitología, su gran visión crítica y su apoyo incondicional nos ha sido de gran ayuda a lo largo del tiempo que ha ocupado la realización de este estudio.

A la Dra. Mercedes Durfort Coll, Jefe de la Unidad de Biología Celular y Catedrática de Biología Celular del Departamento de Bioquímica y Fisiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, por haberme ofrecido la colaboración de su Unidad, poniendo a mi alcance los medios necesarios para completar la parte experimental de esta Tesis Doctoral. Y especialmente, al Dr. Josep Garcia Valero, Pro-

fesor Titular de Biología Celular del Departamento de Bioquímica y Fisiología, gracias a cuya inestimable colaboración me ha sido posible iniciarme en el excitante campo de la Microscopia Electrónica, sin la cual habría sido imposible la elaboración de una de las partes fundamentales de esta Tesis Doctoral.

Al Dr. Jaime Prat Díaz de Losada, Jefe del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y Catedrático de Anatomía Patológica del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, y a todos los adjuntos y personal técnico del Servicio, por las múltiples dudas que me han resuelto y su valiosa colaboración en la obtención de cortes histológicos y la elaboración de los estudios estructurales a nivel de la microscopia óptica, y de modo especial a la supervisora del Servicio Dña. Dolors Cardona y a Dña. Elena Llorens, que siempre han estado prestas en facilitarme su colaboración, y a la Dra. Conchita Murcia que me inició en las técnicas de inmunolocalización.

A todos los compañeros del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau que tan cordialmente me acogieron y especialmente al Dr. Pedro Coll Figa y a Dña Paquita March Vallverdu por brindarme de forma desinteresada su colaboración.

También hago extensible mi reconocimiento al Dr. Ramón Trias Rubies, jefe del Servicio de Cirugía Digestiva del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, por su interés mostrado y su colaboración en la obtención de material hidatídico humano.

Deseo que también quede constancia de mi agradecimiento a Don Guillermo Cubero Veterinario jefe del matadero Municipal de Zaragoza, a Dña Charo Martínez y a todo el equipo de dicho centro, por todas las facilidades aportadas en la obtención de material hidatídico.

No puedo olvidar a Dña. Cristina Sánchez Reus, que amablemente ha colaborado en la maquetación de esta Tesis Doctoral.

A ellos, y a todos los que de una forma u otra hayan contribuido a la elaboración de este trabajo, deseo manifestarles mi mas sincero agradecimiento.

INDICE

PREFACIO	1
INTRODUCCION	3
I. DESCRIPCION GENERAL DEL PARASITO <i>Echinococcus granulosus</i>	7
A. Situación taxonómica del genero <i>Echinococcus</i>	7
B. Estructura y morfología del parásito adulto.....	8
C. Estructura y morfología del huevo.....	9
D. Desarrollo, estructura y morfología de la larva	10
E. Ciclo biológico.....	20
F. Variaciones intraspecíficas de <i>E. granulosus</i>	23
II HIDATIDOSIS	25
A. Cuadro clínico de la hidatidosis humana	26
B. Diagnóstico de la hidatidosis humana.....	28
C. Distribución geográfica y prevalencia.....	37
III ANTIGENOS PARASITARIOS	41
A. Origen de los antígenos parasitarios	42
B. Caracterización y nomenclatura de los antígenos hidatídicos.....	44
C. Especificidad de los antígenos hidatídicos	49
OBJETIVOS	51
MATERIAL Y METODOS	54
I. MATERIAL PARASITARIO	64
A. Obtención del material parasitario	65
B. Procesamiento del líquido hidatídico bruto.....	69
C. Procesamiento de la arena hidatídica.....	75
D. Procesamiento de las membranas quísticas.....	78
II. CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS INMUNOGENICAS DE	
A. <i>E. granulosus</i>	83
B. Separación de los componentes proteicos.....	84
C. Identificación de las proteínas inmunogénicas	88
D. Determinación del peso molecular	91
III. ANTISUEROS	92
A. Antisueros humanos.....	93
B. Obtención de antisueros por inmunización experimental en conejos.....	94

IV. DESARROLLO DE PROTOSCOLEX CULTIVADOS <i>IN VITRO</i> , PRODUCCION DE ANTIGENOS DE SECRECION-EXCRECION	102
A. Desarrollo <i>in vitro</i> de <i>E. granulosus</i>	103
B. Estudio de la producción de antígenos de secreción-excreción	104
V. LOCALIZACION INMUNOHISTOLOGICA DE LAS FRACCIONES ANTIGENICAS	108
A. Estudios estructurales en el metacestodo de <i>E.</i> <i>granulosus</i>	109
B. Inmunolocalización de las fracciones antigénicas	120
RESULTADOS	136
I. OBTENCION Y PROCESAMIENTO DEL MATERIAL PARASITARIO	142
II. CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS INMUNOGENICAS DE <i>E. granulosus</i>	143
A. Separación de los componentes proteicos del líquido hidatídico	144
B. Identificación de las proteínas inmunogénicas.....	149
III. OBTENCION DE ANTISUEROS POR INMUNIZACION EXPERIMENTAL EN CONEJOS	154
A. Purificación de las fracciones antigénicas.....	155
B. Obtención de antisueros : cinética de producción de anticuerpos y estudio de la especificidad	158
C. Purificación de los antisueros	165
IV. DESARROLLO DE PROTOSCOLEX CULTIVADOS <i>IN VITRO</i> , PRODUCCION DE ANTIGENOS DE SECRECION-EXCRECION	169
A. Procesamiento de la arena hidatídica	170
B. Desarrollo <i>in vitro</i> de <i>E. granulosus</i>	175
C. Estudio de la producción de antígenos de secreción-excreción	185
V. LOCALIZACION INMUNOHISTOLOGICA DE LAS FRACCIONES ANTIGENICAS	188
A. Estructura de <i>E. granulosus</i> por microscopia optica.....	189
B. Estructura de <i>E. granulosus</i> por microscopia electrónica	202
C. Inmunolocalización de las fracciones antigénicas por microscopia optica	218
D. Inmunolocalización de las fracciones antigénicas por microscopia electrónica	231

DISCUSION.....	241
I. CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS INMUNOGENICAS DE <i>E. granulosus</i>	243
II. OBTENCION DE ANTISUEROS MONOESPECIFICOS POR INMUNIZACION EXPERIMENTAL DE CONEJOS.....	254
III. DESARROLLO DE PROTOCOLEX CULTINADOS <i>IN VITRO</i>, PRODUCCION DE ANTIGENOS DE SECRECION-EXCRECION	258
IV. ESTRUCTURA DE <i>E. granulosus</i> A NIVEL DE LA MICROSCOPIA OPTICA Y ELECTRONICA	262
V. INMUNOLocalIZACION DE LAS FRACCIONES ANTIGENICAS	268
CONCLUSIONES	276
BIBLIOGRAFIA	280
APENDICE	S16

PREFACIO

La hidatidosis es según la OMS, tanto por sus implicaciones en patología humana como por las pérdidas animales que supone, una de las cuatro zoonosis parasitarias con mayor trascendencia a nivel mundial.

Su distribución, aunque muy cosmopolita, presenta variaciones geográficas de incidencia y prevalencia, destacándose como área hiperendémica la cuenca mediterránea, en la que se encuentra España con una incidencia anual cercana a los 6 casos por cada 100.000 habitantes y año.

La hidatidosis se adquiere generalmente en la infancia, pero debido a su lento crecimiento, la clínica suele ser de presentación tardía e inespecífica, siendo el diagnóstico muchas veces casual o a resultas de la aparición de complicaciones más o menos graves, y siempre en estadios bastante avanzados de la enfermedad que, requieren, si es posible, de la aplicación de técnicas quirúrgicas complejas para conseguir extirpar la masa quística intacta.

El diagnóstico de laboratorio se basa preferentemente en la detección de la respuesta inmune que desencadena el hospedador frente a las estructuras antigénicas del parásito, pero las pruebas serológicas disponibles presentan cierta inespecificidad, y no todos los pacientes afectados de hidatidosis son inmunorreactivos a los antígenos conocidos, especialmente en las fases iniciales de la parasitosis.

En la actualidad, se están realizando grandes esfuerzos para conseguir mejorar el diagnóstico serológico de la hidatidosis y desarrollar una vacuna útil que permita controlar esta zoonosis.

El diagnóstico serológico de la hidatidosis, es uno de los problemas que, desde inicios de la década de los 80, ha sido tema preferente de estudio en nuestro servicio, habiendo sido merecedor de varias becas y ayudas, entre las que deben destacar las otorgadas por el Fondo de Investigaciones Sanitarias a dos proyectos de investigación trianuales, entre cuyos frutos se encuentra esta tesis.

Entre los trabajos previos desarrollados por nuestro grupo, destaca la tesis doctoral elaborada por la Dra. Carmen Muñoz (1986) sobre el valor de las técnicas serológicas en el diagnóstico y control de la

PREFACIO

hidatidosis humana, en la que se concluía indicando que : "La complejidad antigénica del líquido hidatídico y las variaciones inherentes a su composición, consecuencia de varios factores: cepa del parásito, hospedador del que fue extraído, estado fisiológico de la larva, quimioterapia recibida por el hospedador, y otros todavía no determinados, dificultaban enormemente la valoración serológica de un paciente hidatídico, hasta tal punto que el antígeno utilizado sería un condicionante fundamental del resultado de la determinación serológica; y por tanto deberían incrementarse los esfuerzos hacia la caracterización química y biológica de las distintas fracciones antigénicas presentes en el líquido hidatídico, así como determinarse las circunstancias que inducen a su aparición y desaparición, y el papel que cada una de ellas juega en la estimulación de la respuesta inmune del hospedador en el curso de la infestación y quimioterapia."

Es por ello que, en base a los argumentos antes planteados y con el afán de profundizar en el conocimiento de los antígenos hidatídicos y aportar nuevos datos que permitiesen una mejor comprensión de la relación huésped parásito, en la presente tesis doctoral se identificaran los componentes proteicos del líquido hidatídico, se caracterizaran las proteínas inmunogénicas de *E. granulosus* con valor diagnóstico y se localizaran a nivel estructural y ultraestructural las fracciones antigénicas mayoritarias, intentando evaluar sus posibles mecanismos de síntesis y liberación.

INTRODUCCION

- I DESCRIPCION GENERAL DEL PARASITO *Echinococcus granulosus*
 - A. Situación taxonómica del genero *Echinococcus*
 - B. Estructura y morfología del parásito adulto
 - C. Estructura y morfología del huevo
 - D. Desarrollo, estructura y morfología de la larva
 - 1. quiste hidatídico madre
 - 2. vesículas prolíferas
 - 3. protoscólex
 - 4. vesículas hijas
 - 5. líquido hidatídico
 - E. Ciclo biológico
 - 1. ciclo
 - 2. especificidad y susceptibilidad
 - a. hospedador definitivo
 - b. hospedador intermediario
 - F. Variaciones intraspecíficas de *E. granulosus*

II HIDATIDOSIS**A. Cuadro clínico de la hidatidosis humana**

1. hidatidosis hepática
2. hidatidosis pulmonar
3. hidatidosis cardíaca
4. hidatidosis del sistema nervioso central
5. hidatidosis ósea

B. Diagnóstico de la hidatidosis humana

1. diagnóstico clínico
2. diagnóstico morfológico
 - a. radiología convencional
 - b. gammagrafía hepática
 - c. ecografía
 - d. tomografía axial computarizada
 - e. resonancia magnética nuclear
3. diagnóstico de laboratorio
 - a. intradermorreacción de Casoni
 - b. fijación del complemento
 - c. pruebas de aglutinación indirecta
 - d. métodos de precipitación en geles
 - e. pruebas indirectas con anticuerpos marcados
 - (1) inmunofluorescencia indirecta
 - (2) técnicas de enzimoinmunoensayo
 - (3) radioinmunoensayo

C. Distribución geográfica y prevalencia

1. estado actual de la hidatidosis en España

III ANTIGENOS PARASITARIOS

A. Origen de los antígenos parasitarios

1. antígenos estructurales
2. antígenos solubles

B. Caracterización y nomenclatura de los antígenos hidatídicos

1. antígeno 5
2. antígeno B
3. otras fracciones antigénicas
4. antígenos recombinantes

C. Especificidad de los antígenos hidatídicos

DESCRIPCION GENERAL DEL PARASITO

SITUACION TAXONOMICA DEL GENERO ECHINOCOCCUS

E. granulosus pertenece al genero *Echinococcus* Rudolphi 1801 que, según una de las últimas revisiones, podría agrupar a un total de 16 especies y 13 subespecies (Kumaratilake & Thompson 1982), aunque tan solo cuatro tienen características bien definidas y son taxonómicamente aceptadas : *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* y *E. vogeli*. Es de destacar la existencia de variantes definidas por variaciones genómicas intraespecíficas especialmente asociadas a áreas geográficas u hospedadores intermediarios (McManus & Rishi 1989). De entre las cuatro especies, solo la variante de *E. granulosus* ovino/bovino/humano presenta una amplia distribución en nuestro país (Cuesta-Bandera, McManus & Rishi 1988).

ESTRUCTURA Y MORFOLOGIA DEL VERME ADULTO

E. granulosus es un cestodo de pequeño tamaño (5-7 mm de longitud), en el que se distinguen tres regiones bien diferenciadas: escólex, cuello y estróbilo.

El escólex está provisto de cuatro ventosas y 30 o 40 ganchos dispuestos en dos filas.

El cuello, es corto, delgado e insegmentado, y es el que origina los proglótides.

El estróbilo está formado por tres o cuatro proglótides, el penúltimo de los cuales contiene los órganos sexuales constituidos por un ovario bilobulado y alrededor de 50 testículos, el último constituye el anillo grávido (Noble & Noble 1982; Thompson 1986; Schmidt & Roberts 1989) (Fig 1).

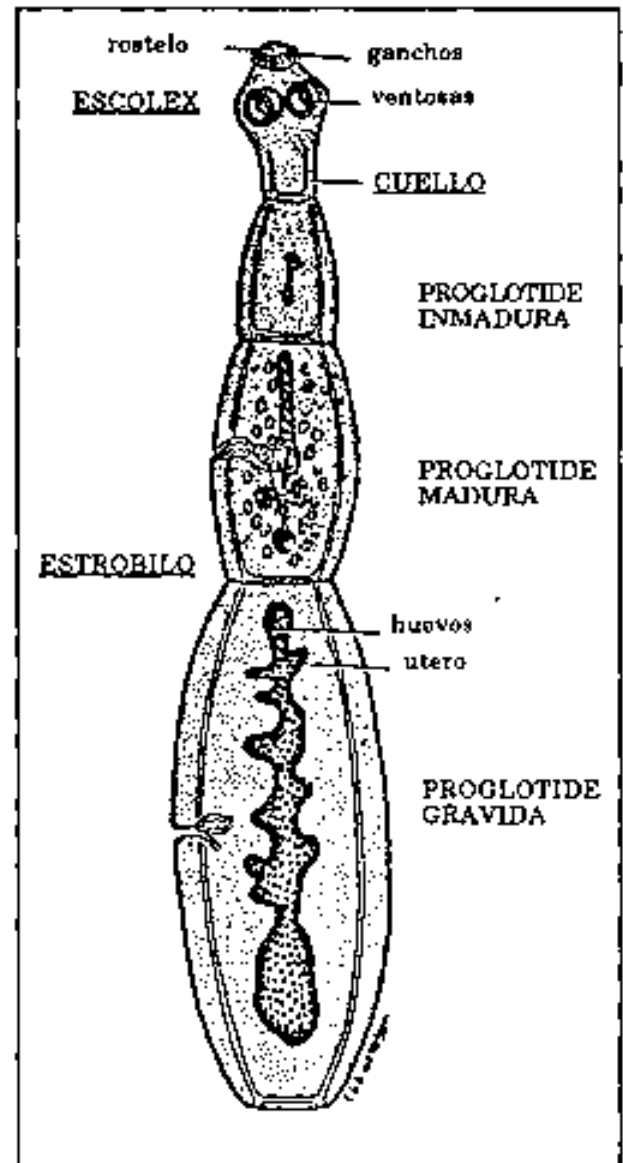


Figura 1. Esquema de verme adulto de *E. granulosus*. (según Brown en Noble ER, Noble GA, 1982).

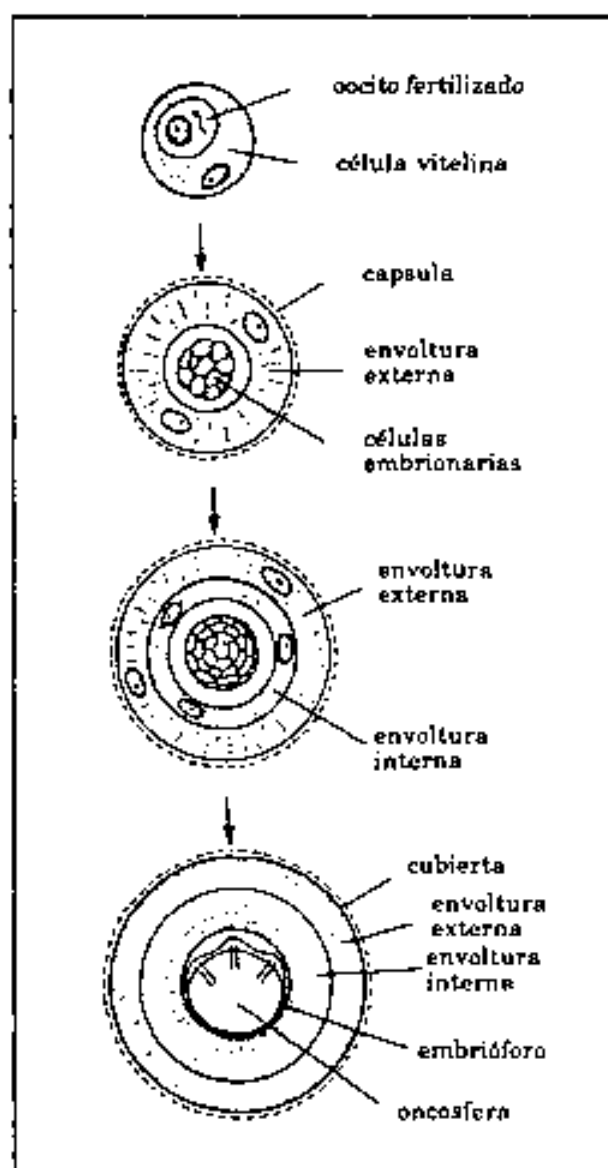


Figura 2. Esquema general del desarrollo embrionario de la oncosfera en el orden de los Cyclophyllidae. (según Rybicka K. en Schmidt GD, Roberts LS. 1989).

ESTRUCTURA Y MORFOLOGIA DEL HUEVO

Los huevos fecundados, tras un proceso de embriogénesis, desarrollarán una larva hexacanta u oncosfera con estructuras altamente diferenciadas y especializadas: glándulas, fibras musculares y ganchos (Swiderski Z. 1983). El proceso de embriogénesis se realiza en el interior del útero y, los huevos eliminados son las formas metacíclicas capaces de infectar a un hospedador intermedio.

La oncosfera se encuentra protegida por una gruesa e impermeable membrana interna o embrióforo, rodeado de una delgada membrana vitelina externa (Noble & Noble 1982; Ubelaker 1983b; Thompson 1986; Schmidt & Roberts 1989) (Fig 2).

DESARROLLO, ESTRUCTURA Y MORFOLOGIA DE LA LARVA O METACESTODO

El quiste hidatídico o hidátide se considera un segundo estadio larvario, que se inicia en la oncosfera.

La oncosfera sufrirá una serie de cambios de desdiferenciación, reabsorción y diferenciación de tejidos que, acompañados de un incremento de tamaño, dan lugar a una nueva forma estructural conocida como metacestodo o quiste hidatídico. El desarrollo de la larva hidatídica se considera un proceso neotérico de tipo cisticerco, que se caracteriza por ser un desarrollo endógeno a partir de una *primary lacuna* o vesícula inicial incorporada dentro del metacestodo (Freeman 1970; Ubelaker 1983a; Schmidt & Roberts 1989).

QUISTE HIDATIDICO MADRE

La aparición de una vesícula inicial en el interior de la oncosfera y el incremento progresivo del tamaño de ésta, irá desplazando las estructuras larvarias y dará lugar a una gran cavidad rodeada de una fina pared (Ubelaker 1983a), que se verá reforzada por la aposición externa de una sustancia amorfa en disposición laminar de origen incierto denominada membrana laminar (Harris, Heath, Lawrence & Shaw 1989).

El quiste hidatídico, o forma metacestódica de *E. granulosus* es pues una cavidad quística, típicamente unilocular, en la que se distingue una fina pared interna o membrana germinativa rodeada de una envoltura más externa o membrana laminar que, *in vivo*, se encontrara rodeada por una envoltura fibrosa o membrana adventicia formada por la reacción del tejido del hospedador frente al parásito (Fig 3). En el interior de un quiste fértil podremos encontrar otras formaciones quísticas menores: vesículas prolíferas y vesículas hijas, así como protoscólex; bañados todos ellos por el llamado líquido hidatídico (Sparks, Connor & Neafie 1976).

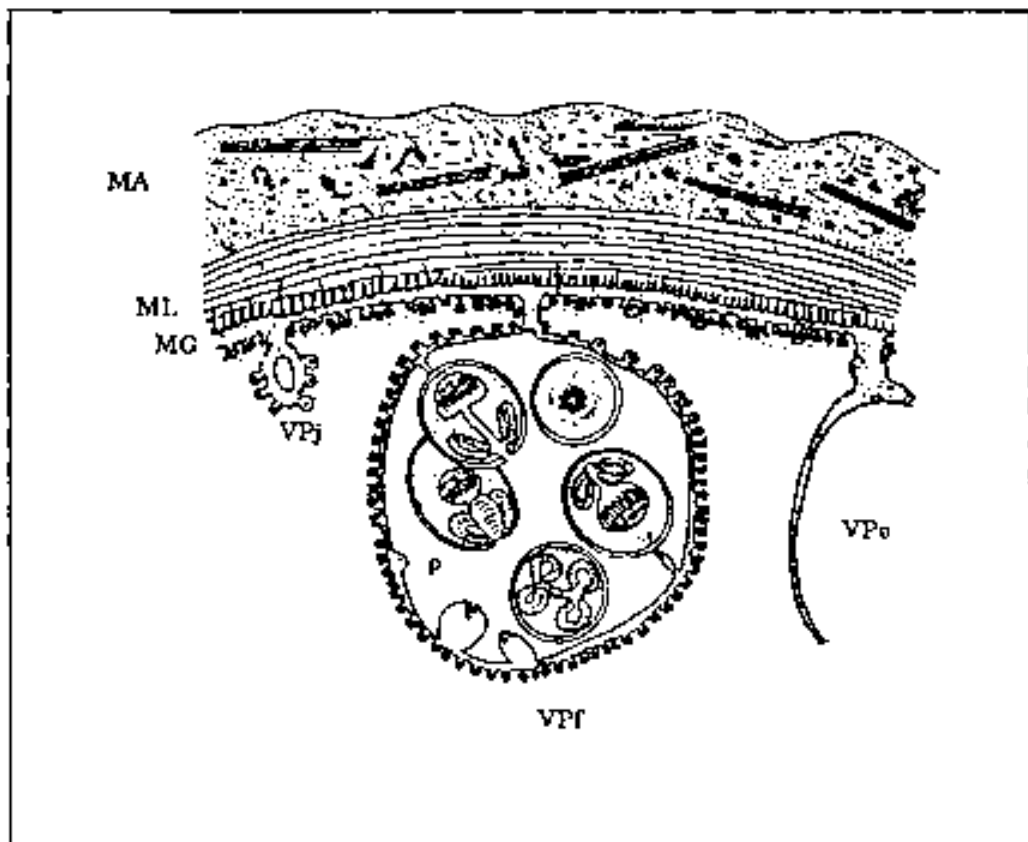


Figura 3. Esquema de una porción de quiste hidatídico de *E. granulosus*. (según Goodchild en Ubelaker JE. 1983a). MA: membrana adventicia; ML: membrana laminar; MG: membrana germinativa; VPj: vesícula proliferadora joven; VPf: vesícula proliferadora fértil; VPe: vesícula proliferadora estéril; P: protoscolex.

En la membrana germinativa podemos distinguir dos regiones : una región germinativa y una conectiva (Ubelaker 1983a). La región germinativa es un sincitio celular con estructura muy similar a la del tegumento del verme adulto o el tegumento de la oncosfera. En ella se diferencia una zona más interna nuclear, proliferativa, conectada por puentes citoplasmáticos a la zona externa del citoplasma sincitial (Morseth 1967a; Delabre, Gabrion, Contat, *et al.* 1987). La región conectiva, en íntimo contacto con la cavidad quística, esta compuesta esencialmente de restos ce-

lulares más o menos bien definidos (Rodríguez-Caabeiro & Casado 1988; Casado & Rodríguez-Caabeiro 1989a). Recubriendo la membrana germinativa, se encuentra la membrana laminar, íntimamente adherida mediante unas microtriquias truncadas que, partiendo del citoplasma sincitial de la membrana germinativa se adentran en la membrana laminar (Morseth 1967a).

La membrana laminar es una estructura mucoproteica (Rogan & Richards 1989), anhieta, anucleada, compuesta por una matriz microfibrilar con agregados electrodensos (Richards, Arme & Bridges 1983). Aunque se cree secretada por la membrana germinativa (Heath & Osborn 1976; Rogan & Richards 1989), su origen es algo incierto y podría estar modulado por el hospedador (Bortoletti & Fenetti 1973). Desempeña un importante papel de soporte de la presión intraquistica y podría actuar como barrera inmunológicamente inerte (Coltorti & Varela-Díaz 1974).

La membrana adventicia es el resultado de la reacción inflamatoria del hospedador frente al parásito (Slais & Vanek 1980).

VESICULAS PROLIFERAS

Las vesículas proliferas se originan a partir de las células indiferenciadas de la zona nuclear de la membrana germinativa. El proceso se inicia con la mitosis de células indiferenciadas y acumulación de estas en una determinada área. Posteriormente la invaginación de la superficie de la membrana y una serie de divisiones mitóticas dará lugar a la aparición de una vesícula inicial que ira progresivamente incrementando de tamaño (Ubelaker 1983a; Thompson 1986; Mehlhorn, Taraschewski, Franz, *et al.* 1988b) (Fig 4).

Las vesículas proliferas están constituidas por una cavidad quística rodeada de una fina pared y, unidas temporalmente a la membrana germinativa por un fino pedículo. La estructura de la pared quística es idéntica a la de la membrana germinativa, pero con una disposición invertida, estando el citoplasma sincitial y las microtriquias en el interior y la zona nuclear en el exterior. Carecen de membrana laminar (Ubelaker 1983a; Thompson 1986; Mehlhorn, Taraschewski, Franz, *et al.* 1988b).

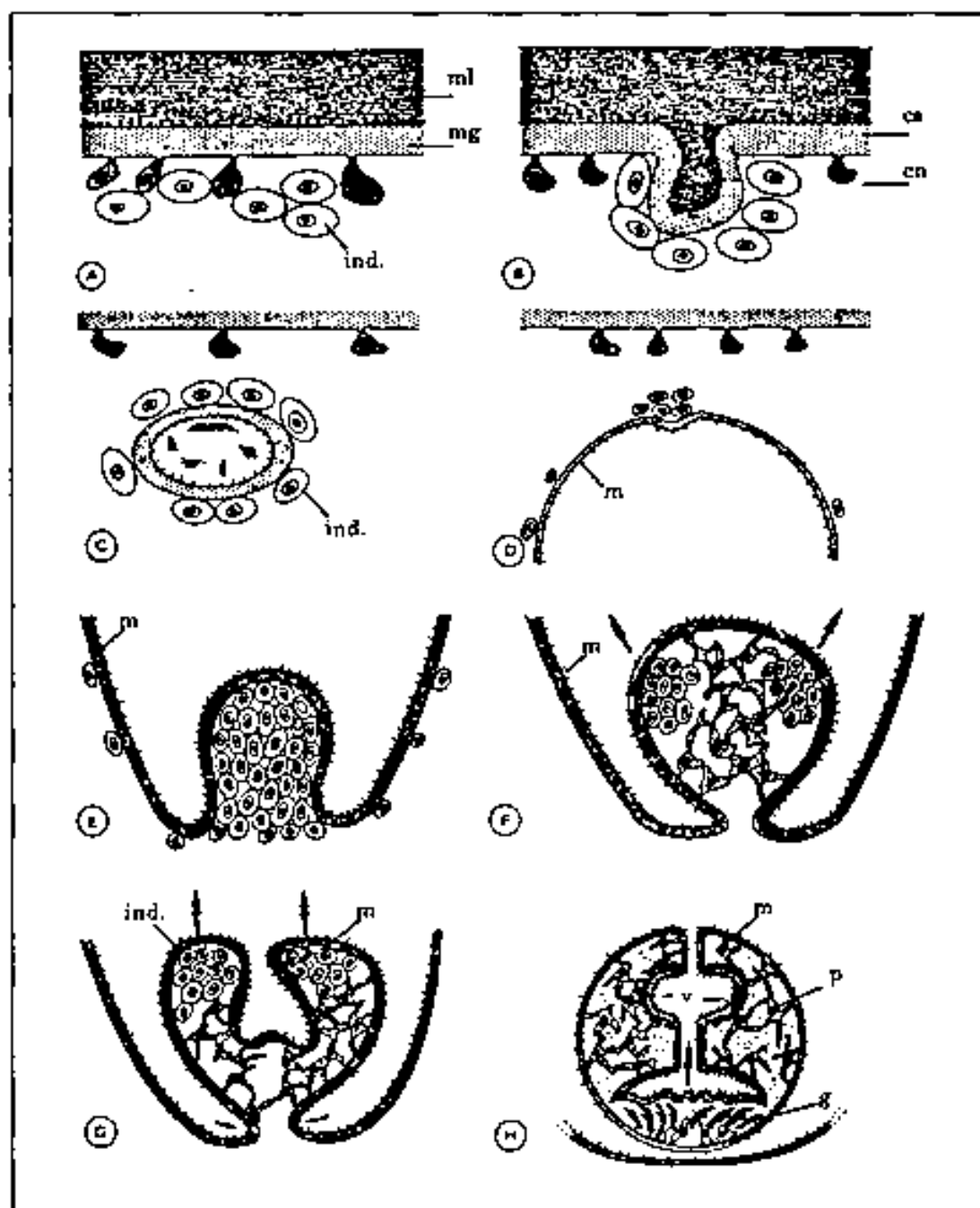


Figura 6. Esquema del desarrollo de las vesículas proliferas (A,B,C) y los protoscolex (D,E,F,G,H) de *E. granulosus*. (según Mehlhorn & Pickaraki en Mehlhorn H, Taraschewski H, Franz M, et al. 1983b). A: pared quiste hidatídico madre; B: invaginación de la membrana germinativa; C: aparición de la cisterna inicial; D: acúmulo de células indiferenciadas; E: invaginación de la pared de la vesícula prolifera; F: multiplicación y diferenciación de las células indiferenciadas; G y H: crecimiento y desarrollo del protoscolex. ml: membrana laminar; mg: membrana germinativa; m: microtriquetas; ca: citoplasma sincitial; cn: citoplasma perinuclear; ind: células indiferenciadas; v: ventosas; g: ganchos; p: células parenquimatosas.

PROTOSCOLEX

La formación de los protoscólex suele originarse en un segundo proceso mitótico en las vesículas prolíferas (Ubelaker 1983a; Rogan & Richards 1987; Mehlhorn, Taraschewski, Franz, *et al.*, 1988b) (Fig 4), aunque también pueden derivar directamente de la membrana germinativa del quiste. Células indiferenciadas se acumularan en la pared de las vesículas prolíferas, ésta se invaginará hacia el interior y, arrastrará consigo las células indiferenciadas que progresivamente irán multiplicándose y diferenciándose hasta definir todas la estructuras del protoscólex, el cual quedara unido a la pared de la vesícula por un fino pedículo (Rogan & Richards 1987) (Fig 5).

En el protoscólex evaginado podemos distinguir macroscópicamente dos regiones claramente diferenciadas : la región del escólex y la región del soma (Fig 6). La región del escólex esta ocupada por cuatro ventosas y un rosetelo armado con una doble corona de ganchos y generalmente se encuentra invaginada en la región del soma. El soma esta ocupado básicamente por células del parénquima, corpúsculos calcáreos y el sistema excretor (Fig 5).

El tegumento de los protoscólex es un sincitio de estructura muy similar al de la membrana germinativa, a través del cual se produce el intercambio de sustancias entre el parásito y su medio circundante (Reisin, Ibarra, Cybel & Cantiello 1985). Se distingue una zona externa citoplasmática, en sincitio, que descansa sobre una fina membrana laminar y conecta con una zona más interna nucleada a través de puentes citoplasmáticos. En la zona del citoplasma distal se encuentran gran cantidad de vesículas, vacuolas, gránulos electrodensos y mitocondrias, y destacan numerosas proyecciones digitiformes cubiertas de membrana, que se conocen como microtriquias. En la región del escólex estas microtriquias son muy abundantes y poseen una larga espina electrodensa, mientras que en la región del soma estas son prácticamente inapreciables, quedando reducidas a pequeñas elevaciones sin espina electrodensa completamente recubiertas por un glicocalix P.A.S. (Schiff-ácido-periódico) positivo. (Morseth 1967a; Conder, Marchiondo, Williams & Andersen

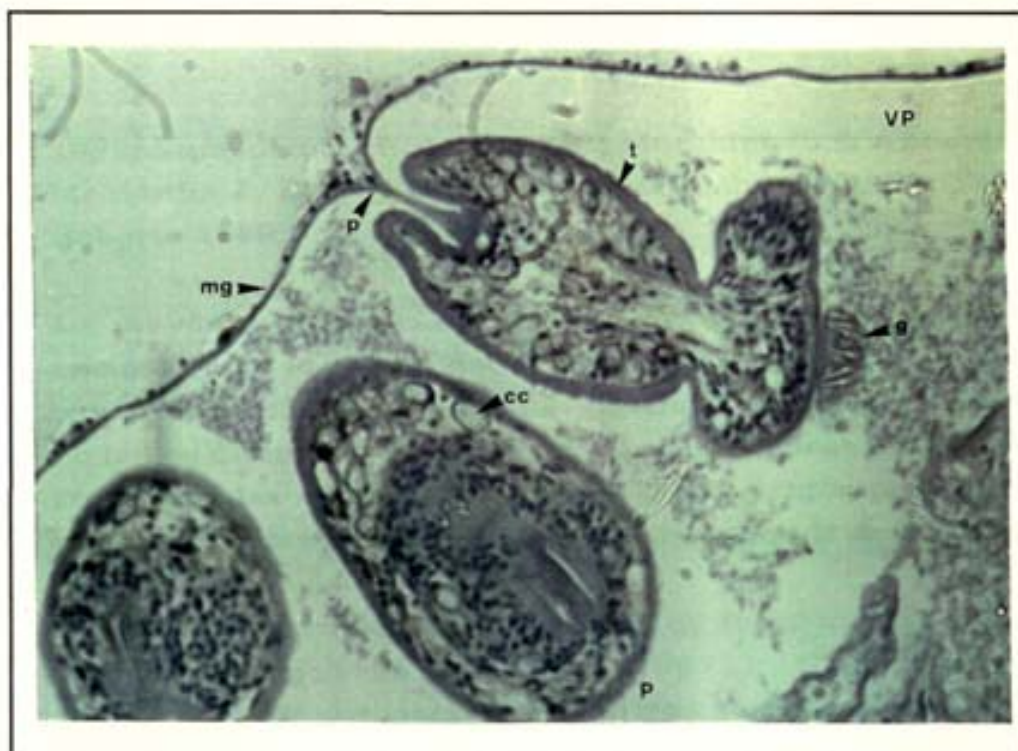


Figura 5. Protoscólex y vesícula prolifera de *E. granulosis* (320x). VP: vesícula prolifera; P: protoscólex; mg: membrana germinativa p: pedículo; t: tegumento; cc: corpúsculos calcáreos; g: ganchos.



Figura 6. Protoscólex de *E. granulosis* (400x). ES: región del escólex; S: región del soma.

1983; Lumsden & Hildreth 1983; Marchiondo & Andersen 1983; McManus & Barret 1985; Rogan & Richards 1989; Schmidt & Roberts 1989).

La mayor proporción de la musculatura de los protoscólex se encuentra en la región del escólex, formando parte de las ventosas y anclando la corona de ganchos; en la región del soma podemos distinguir debajo del tegumento fibras longitudinales y transversales responsables de los movimientos peristálticos del parásito (Lumsden & Hildreth 1983; Schmidt & Roberts 1989).

El sistema excretor de los protoscólex se inicia en las llamadas células flamíferas (Morseth 1967a). Estas son células protonefrídicas que, actuando de filtro y sistema propulsor, dirigen fluidos extracelulares a un sistema colector activo. Las células flamíferas se encuentran distribuidas por todo el parénquima de los protoscólex y están conectadas con un sistema canalicular de túbulos de diferentes tamaños que abocarán a unos túbulos principales, los cuales se abren al exterior en un poro excretor, para vaciar así su contenido en el interior de la cavidad quística (Lumsden & Hildreth 1983; Schmidt & Roberts 1989).

En el parénquima de los protoscólex, se distinguen una gran cantidad de corpúsculos calcáreos. Los corpúsculos calcáreos tienen un origen celular y están constituidos por compuestos inorgánicos, mayoritariamente : calcio, magnesio, fósforo y carbonato, depositados sobre una matriz orgánica, la cual generalmente esta organizada en líneas concéntricas, y contiene proteínas, lípidos, glicógeno, mucopolisacáridos, fosfatasa alcalina, RNA y DNA (Lumsden & Hildreth 1983; Pawlowski, Yap & Thompson 1988; Schmidt & Roberts 1989).

VESICULAS HIJAS

Son formaciones quísticas con idéntica estructura a la descrita para el quiste hidatídico madre, pero que a diferencia de éste no derivan directamente de la oncosfera (Eckert, Thompson & Mehlhorn 1983; Mehlhorn, Eckert & Thompson 1983; Thompson 1986).

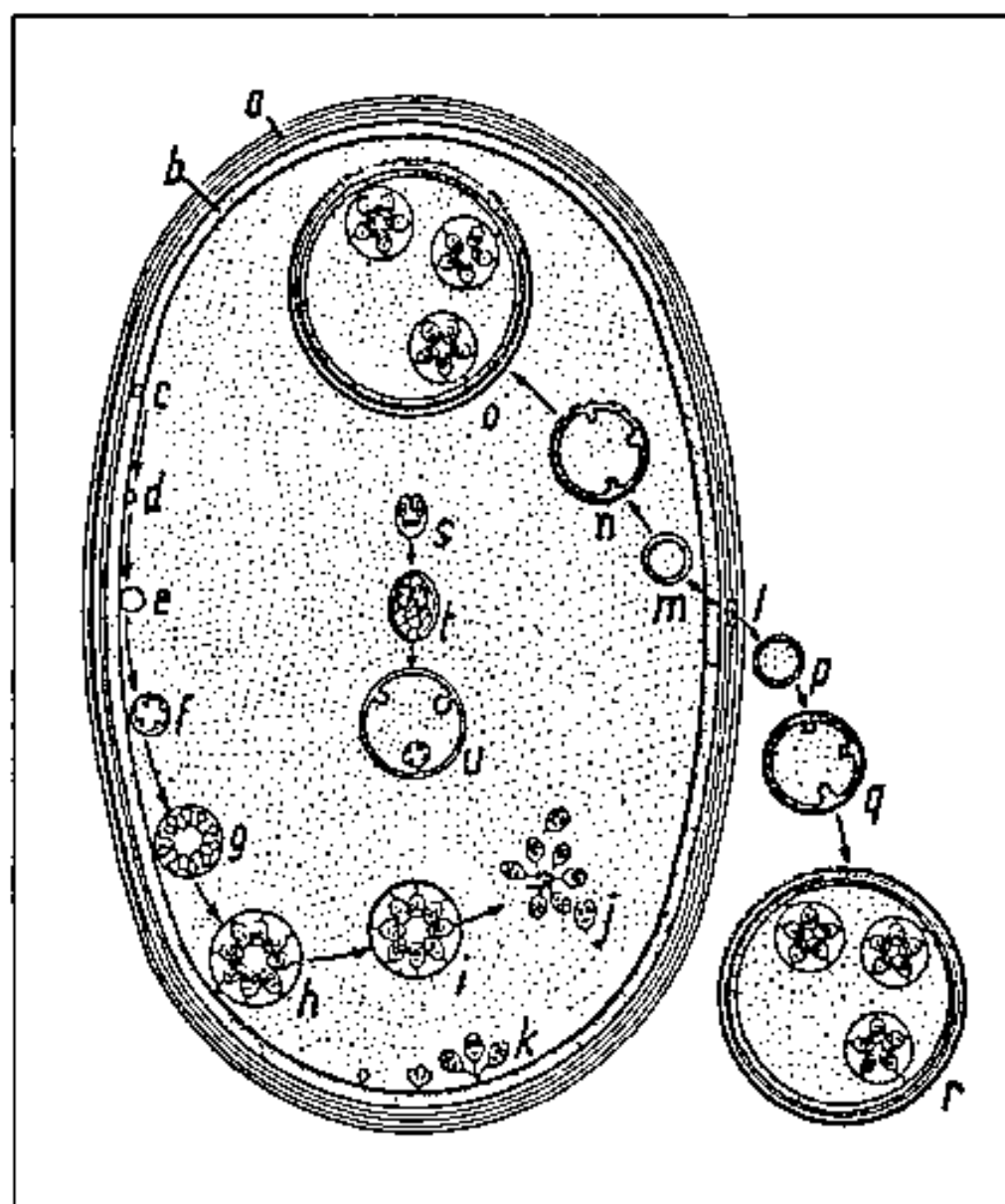


Figura 7. Larva de *E. granulosa* y esquema de la formación de las vesículas proliferas y las vesículas hijas. (según Gracia F, Gallego J, Gil J. 1984). a: membrana laminar; b: membrana germinativa; c-d: formación de una vesícula proliferadora; f: rotura de una vesícula proliferadora; k: arenilla hidatídica; l-o: formación de una vesícula hija endógena; l-r: formación de una vesícula hija exógena; s-u: vesiculación de un escólex y formación de una vesícula endógena.

Las vesículas hijas exógenas, derivan de pequeños islotes de membrana germinativa atrapados en la membrana laminar de un quiste hidatídico madre (Gracia, Gallego & Gil 1964; Mehlhorn, Taraschewski, Franz, *et al.* 1988b) (Fig 7). Las vesículas hijas endógenas suelen ser de origen cefálico, es decir, provienen de un protoscólex (Heath & Osborn 1976; Richards & Morris 1989). Estudios "in vitro" demuestran como los protoscólex pueden derivar a vesícula hija por vesiculización del parásito (Fig 8), o tras la formación y liberación de una vesícula en el polo posterior del soma (Fig 9) (Smyth 1967; Rogan & Richards 1986a; Rodríguez-Caabeiro & Casado 1988; Casado & Rodríguez-Caabeiro 1989a).

LIQUIDO HIDATIDICO

Es el contenido líquido de un quiste hidatídico, vesícula prolifera o vesícula hija. De no estar alterada la larva, es un líquido transparente, que tradicionalmente se describe como en agua de roca.

Su composición bioquímica es variable en función de la localización del quiste y el hospedador que lo albergue (Rodríguez-Caabeiro, Casado & Jimenez 1989a). Contiene alrededor de un 99,9 % de agua y, su residuo seco esta constituido básicamente por proteínas, hidratos de carbono, lípidos y sales (McManus & Smyth 1978; Vidor, Piens, Abbas & Petavy 1986; Sultan Sheriff, El Fakhri & Kidwai 1989).

El líquido hidatídico, es considerado la principal fuente de obtención de proteínas parasitarias útiles en el diagnóstico serológico de la hidatidosis (Dottorini & Tassi 1978), aunque también es de destacar la presencia en este de proteínas procedentes del hospedador, básicamente albúmina e inmunoglobulinas (Chordi & Kagan 1965; Coltorti & Varela-Díaz 1972; Varela-Díaz & Coltorti 1972; Coltorti & Varela-Díaz 1974; Coltorti & Varela-Díaz 1975; Edwards 1982; Vidor, Piens & Garin 1987).



Figura 8. Protoscolex en fase de vesiculización (100x).

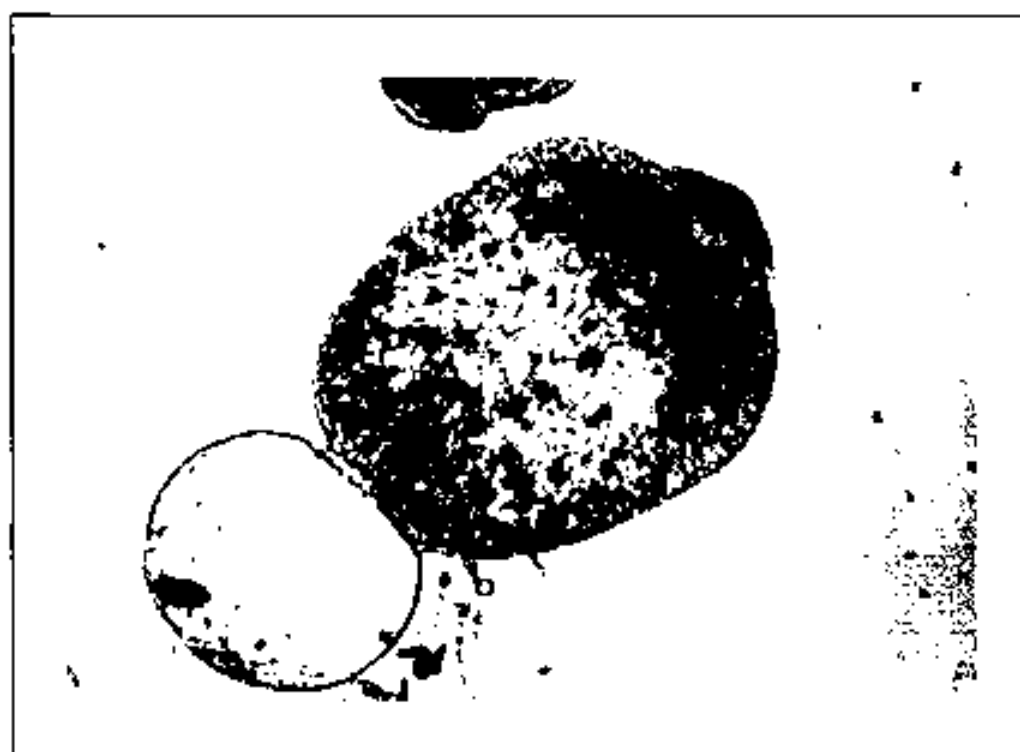


Figura 9. Protoscolex con vesícula en polo posterior (200x).

CICLO BIOLÓGICO

En el ciclo doméstico de *E. granulosus* el perro actúa como hospedador definitivo y los équidos y ruminantes domésticos (oveja, vaca, cabra, caballo, etc.) como hospedadores intermediarios (Smyth 1969; Noble & Noble 1982; Euzeby 1983; Rausch 1986; Mehlhorn & Walldorf 1988a; Schmidt & Roberts 1989).

CICLO

El desarrollo del cestodo adulto en el hospedador definitivo ocurre tras la ingestión de quistes hidatídicos fértiles localizados en las vísceras de los hospedadores intermediarios. Una vez ingeridos la pared quística es digerida y se produce la liberación de numerosos protoscólex que, en condiciones óptimas evaginarán e irán a establecerse agrupados en la primera porción del intestino delgado del hospedador definitivo (Lymbery, Hobbs & Thompson 1989a) en donde se desarrollarán y alcanzarán su madurez sexual.

La propagación a los hospedadores intermediarios se realiza mediante huevos liberados al exterior a través de las heces. Tras su ingesta, la oncosfera, se libera de sus envolturas y se activa, atraviesa la mucosa intestinal y, generalmente por vía portal alcanza el parénquima hepático en donde se desarrollará la forma metacestódica, aunque también puede alcanzar otros órganos.

El ciclo se completa cuando el hospedador definitivo se infesta al ingerir vísceras de hospedadores intermediarios con quistes hidatídicos fértiles (Fig. 10).

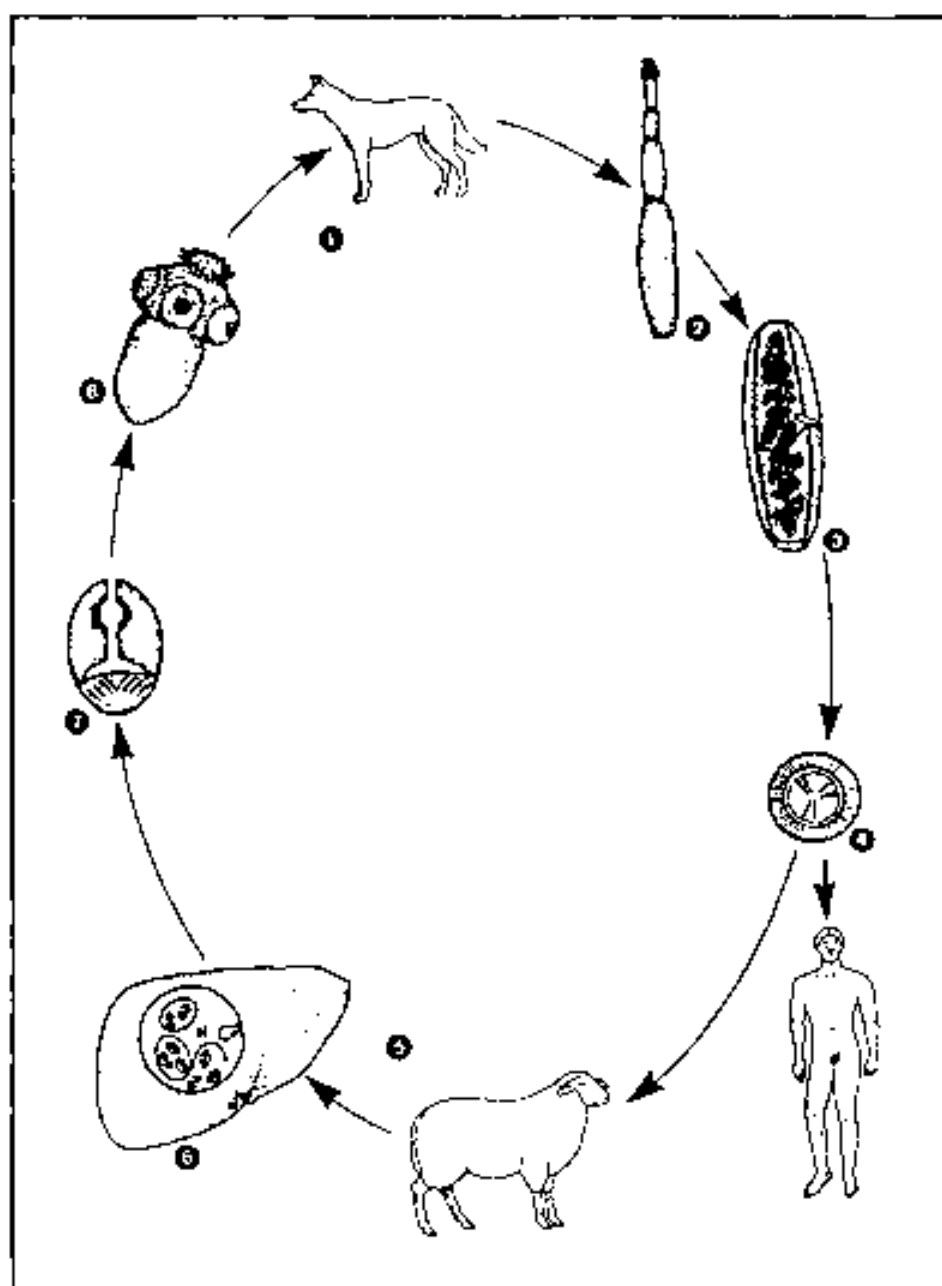


Figura 10. Ciclo biológico de *E. granulosus* (según Mehlhorn H, Walldorf V, 1988a) 1: hospedador definitivo; 2: verme adulto; 3: proglótide fértil; 4: oncosfera; 5: hospedador intermediario; 6: quiste hidatídico; 7: protoscolex invaginado; 8: protoscolex evaginado.

ESPECIFICIDAD Y SUSCEPTIBILIDAD

El que un animal actúe como hospedador definitivo o intermedio esta en función de una serie de condiciones filogenéticas, inmunológicas, bioquímicas o fisiológicas de éste, asociadas a peculiaridades del parásito.

HOSPEDADOR DEFINITIVO

La estructura anatómica del intestino, así como el tamaño y forma de las glándulas de Lieberkühn y de las microvellosidades intestinales parecen ser factores relacionados con el desarrollo y maduración sexual del parásito.

La composición de la bilis es una variable importante relacionada con la supervivencia de éstos en el tracto digestivo del hospedador. Estudios "in vitro" demuestran como ciertos ácidos biliares (deoxicolato y chenodeoxicolato) presentes en la bilis de los herbívoros son capaces de lisar el tegumento de los protoscólex y hacerlos inviables (Smyth 1968).

HOSPEDADOR INTERMEDIARIO

Parece ser que la rotura del embrióforo y la activación de la oncosfera esta estimulada por ciertos componentes presentes en la bilis, el jugo intestinal y el jugo pancreático, sin los cuales la eclosión de los huevos no se produce. Por otro lado, también existen mecanismos reguladores, como son la resistencia natural o adquirida, que modularán la infestación del hospedador.

VARIACIONES INTRAESPECIFICAS DE *E. granulosus*

La evidencia de diferencias fisiológicas (desarrollo *in vitro*) entre poblaciones de *E. granulosus* (Smyth & Davies 1974), y la posterior confirmación de su asociación a diferencias bioquímicas (DNA, isoenzimas, proteínas solubles) y metabólicas (Kumaratilake, Thompson & Dunsmore 1979; Smyth 1982) supuso la introducción del concepto de cepa o variación intraespecífica para enfatizar diferencias dentro de una clasificación taxonómica excesivamente simple basada fundamentalmente en caracteres morfológicos (Kumaratilake & Thompson 1982; Thompson & Lymbery 1990).

Se cree que la reproducción asexual indefinida del metacestodo favorece y potencia la aparición de mutantes, al mismo tiempo que asegura su continuidad y da lugar a la aparición de una nueva cepa con características propias o especialmente adaptada a un hospedador concreto (Thompson 1986).

Los criterios para la diferenciación y caracterización de variaciones intraespecíficas o cepas de *E. granulosus* pueden ser de índole morfológicos (Kumaratilake & Thompson 1984a; Kumaratilake, Thompson & Eckert 1986; Hobbs, Lymbery & Thompson 1990), metabólicos (McManus & Smyth 1978; McManus & Smyth 1982), bioquímicos (Kumaratilake, Thompson & Dunsmore 1979; Smyth 1982; Kumaratilake & Thompson 1984b; Lymbery & Thompson 1989b), fisiológicos (Smyth & Davies 1974; Smyth 1982), antigénicos (Gottstein, Eckert, Michael & Thompson 1987) y genéticos (Rishi & McManus 1987; Cuesta-Bandera, McManus & Rishi 1988; McManus & Rishi 1989); soliendo asociarse a aspectos epidemiológicos relacionados con el poder infestante del parásito tanto en el huésped intermediario como en el definitivo (Baldock, Thompson & Kumaratilake 1985; Cook 1989).

La aceptación de la existencia de diferentes cepas de *E. granulosus* con diferente patogenicidad, características antigénicas diferentes, e incluso diferente respuesta a la quimioterapia, hacen que sea de vital importancia establecer criterios que permitan diferenciar las variaciones

intraespecíficas (Thompson 1988). La existencia de variaciones genómicas constantes para cada cepa, hace que el estudio del ADN (enzimas de restricción, hibridación, secuenciación) sea el método más sensible en la caracterización de cepas diferentes (McManus 1987a; Thompson, Yap, Lymbery & Pawlowski 1987) pero, la demostración de cierta diversidad genética dentro de una misma cepa impide que simples variaciones genómicas sean suficientes para definir una nueva cepa, debiendo para eso asociarse diferencias clínicas y epidemiológicas significativas (Lymbery & Thompson 1990).

La caracterización genómica de *E. granulosus* aislados en España, confirma la existencia de dos cepas diferentes : la cepa ovina/bovina/humana y la cepa equina aislada solo en burros (Cuesta-Bandera, McManus & Rishi 1988).

HIDATIDOSIS

La equinococosis hidática o hidatidosis, es la infección y desarrollo de la larva de *E. granulosus* en los tejidos humanos.

En la hidatidosis primaria, la larva hexacanta, tras atravesar la mucosa del intestino delgado alcanza una venula y a través del flujo sanguíneo es transportada por el sistema porta hasta el hígado, soliendo ser retenida en el sinusoides hepático. Superado el capilar hepático puede, a través de las venas suprahepáticas y cava inferior, alcanzar el corazón derecho y ser transportada hasta el pulmón, al que también puede llegar, evitando el filtro hepático, a través del sistema linfático. De superarse el capilar pulmonar, el parásito, entraría en la circulación sistémica y podría alcanzar cualquier localización en el cuerpo humano. La hidatidosis secundaria suele ser múltiple, y subsiguiente a la rotura quística y liberación de elementos fértiles (Torres, Cayla & Corominas 1981; De Andres 1984; Schantz 1984; Schwabe 1986; Frenkel, Taraschewski & Voigot 1988).

CUADRO CLINICO DE LA HIDATIDOSIS HUMANA

Las manifestaciones clínicas dependen de la localización, del número, del volumen, de la compresión que pueda efectuar y del estado biológico del quiste (sano, infectado, fisurado, calcificado) pero, en un gran porcentaje de casos, puede permanecer asintomático y ser un hallazgo casual en una exploración rutinaria.

Las alteraciones que el quiste produce dependen, en cierta medida, del órgano donde está localizado pues, el efecto de compresión que ejerce el quiste sobre el parénquima del órgano puede llegar a comprometer la función de este .

HIDATIDOSIS HEPATICA.

Es la forma más frecuente de presentación. Generalmente es primaria. El quiste puede ser único o múltiple y se localiza con más frecuencia en el lóbulo derecho que en el izquierdo, aunque puede ser bilateral. La evolución del quiste suele ser lenta y los síntomas muchas veces no existen o son escasos : dolor en hipocondrio derecho, ictericia, hepatomegalia, masa palpable en hipocondrio derecho, dispepsia, etc. . Las complicaciones más frecuentes son : infección, rotura a vías biliares, rotura intraperitoneal y diseminación, compresión de vías biliares o vasos sanguíneos, etc. (Torres, Cayla & Corominas 1981; Fernandez-Novo & Quemada 1984; Gonzalez, Martin & Dominguez 1985; Schwabe 1986; Hidalgo & Barquet 1987a).

HIDATIDOSIS PULMONAR.

Puede ser primaria o secundaria a quistes hidatídicos hepáticos abiertos a las venas suprahepáticas o a la cava. Suelen ser quistes únicos. Tienen un crecimiento más rápido que los hepáticos y las complicaciones son más frecuentes : infección y fisuración o rotura. Pueden dar sintomatología en forma de dolor costal, tos, hemoptisis, fiebre, disnea y vómica por comunicación bronquial (Torres, Cayla & Corominas 1981; Bravo, Serrano, Varela, *et al.* 1983; Schwabe 1986; Chaouchi, Nouri, Ben Sulah, *et al.* 1988).

HIDATIDOSIS CARDIACA

Es en general primaria. Afecta con mayor frecuencia al ventrículo izquierdo. Suele ser asintomática, aunque puede dar clínica de dolor precordial o trastornos mecánicos. La complicación más importante es la rotura, hacia el pericardio, o más frecuentemente hacia las cavidades cardiacas con el consiguiente embolismo pulmonar o periférico, generalmente acompañado de reacción anafiláctica. (Torres, Cayla & Corominas 1981; Sala, Pare, Abad, *et al.* 1983; Schwabe 1986).

HIDATIDOSIS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Las manifestaciones clínicas suelen ser tempranas, presentándose como un síndrome de hipertensión endocraneana con cefalea, vómitos, trastornos visuales, crisis epilépticas, etc.. Suele afectar a pacientes jóvenes de menos de 15 años (Torres, Cayla & Corominas 1981; Schwabe 1986; Arboix & Marti-Vilalta 1986; Hamdi, Ayachi, Gargouri & Mourad 1990).

HIDATIDOSIS OSEA

Suele originarse en la medula ósea y crecer adaptándose a las cavidades de los huesos, por lo que deberá adoptar una forma microvesicular. Suelen dar trastornos de tipo mecánico o dolor, aunque también es frecuente la fractura patológica (Torres, Cayla & Corominas 1981; Schwabe 1986; De Miguel 1987; Markakis, Markaki, Prevedorou & Bouropoulou 1990).

DIAGNOSTICO DE LA HIDATIDOSIS HUMANA

Clinicamente, el quiste o los quistes hidatídicos evolucionan lentamente y pueden pasar desapercibidos durante muchos años. La sintomatología, cuando existe, no es específica, y depende, como hemos visto anteriormente, de la localización, del número y del tamaño de los quistes. Es por ello, que el diagnóstico paraclínico es especialmente útil en la hidatidosis humana.

DIAGNOSTICO CLINICO

El diagnóstico clínico se basará en las manifestaciones orgánicas que determina el quiste o las complicaciones que este suponga, así como en los datos epidemiológicos del paciente (procedencia, ocupación, antecedentes familiares,...).

La poca especificidad de los datos clínicos, hace que la sospecha clínica deba siempre ser confirmada mediante el diagnóstico morfológico y/o serológico.

DIAGNOSTICO MORFOLOGICO

El diagnóstico morfológico de la hidatidosis se basa en una serie de métodos capaces de demostrar directa o indirectamente la existencia y localización de un quiste hidatídico.

RADIOLOGIA CONVENCIONAL

Agrupar una serie de técnicas en las que la imagen se obtiene sobre una placa radiográfica.

La radiografía simple posee una gama de densidades muy limitada, siendo muchas veces difícil de diferenciar entre la densidad del quiste y la del parénquima del órgano que lo contiene. Generalmente solo aporta datos indirectos de la localización del quiste : ligeros cambios de densidad, alteraciones en el contorno de la viscera o en estructuras vecinas. Tan solo puede ser diagnóstica en el caso de quistes calcificados o parcialmente calcificados.

Las exploraciones radiológicas con contraste pueden evidenciar la impronta que sobre otras vísceras deja el quiste o delimitar un quiste dentro de una viscera, pero en la actualidad han dejado de emplearse en la investigación sistemática del quiste hidatídico (Torres, Cayla & Corominas 1981; Sales & Garcia 1984; Dominguez, Martin, Sagredo, *et al.* 1985).

GAMMAGRAFIA HEPATICA

Es una prueba fármaco dinámica, en la que se emplea un radiofármaco que se fija en el sistema retículo endotelial hepático. Las zonas de destrucción tisular, o los procesos expansivos que desplazan el parénquima, se evidencian como áreas frías; pero su poca capacidad de discernir la naturaleza de las lesiones ha hecho que fuera sustituida por otros métodos diagnósticos como son la ecografía y la tomografía axial computarizada (Torres, Cayla & Corominas 1981; Sales & Garcia 1984; Dominguez, Martín, Sagredo, *et al.* 1985).

ECOGRAFIA (ECO)

Se basa en la emisión de ondas ultrasónicas y en su percepción tras ser reflejadas en las diferentes estructuras de un órgano. Permite una fácil evaluación de las lesiones abdominales, ofreciendo una exacta información de localización, volumen y estructura interna, lo que permite efectuar un diagnóstico correcto con un alto margen de seguridad. Solo en caso de quistes complicados, en los que el patrón ecográfico es muy heterógeneo, el diagnóstico diferencial con otras lesiones puede ser dificultoso (Torres, Cayla & Corominas 1981; Sales & Garcia 1984; Dominguez, Martín, Sagredo, *et al.* 1985; Garcia, Martí-Bonmati, Menor, *et al.* 1988; Jain, Gupta, Gupta & Saha 1989; Martí-Bonmati & Menor 1990).

TOMOGRAFIA AXIAL COMPUTARIZADA (TAC)

Es la técnica con más sensibilidad y resolución de las empleadas en el diagnóstico morfológico de la hidatidosis. Con respecto a la ECO, el TAC define mejor el contorno quístico y detecta con mayor sensibilidad la presencia de calcificaciones en la pared quística y la presencia de vesículas hijas. Suele complementar el diagnóstico ecográfico de la hidatidosis.

La imagen se obtiene mediante la medición por computadora de los diferentes densidades de los tejidos que en un determinado corte del organismo son atravesados por un haz de rayos X. Aunque las imágenes obtenidas solo pueden representar unas 16 tonalidades de gris, la densidad o valor de atenuación de un

órgano, tejido o lesión determinada puede discriminarse dentro de una escala de dos mil valores numéricos, lo que confiere a la técnica una gran sensibilidad (Torres, Cayla & Corominas 1981; Manchon 1982; Sales & Garcia 1984; Dominguez, Martin, Sagredo, *et al.* 1985; Garcia, Marti-Bonmati, Menor, *et al.* 1988; Marti-Bonmati, Menor 1990).

RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (RM)

El descubrimiento del principio de la resonancia magnética data de 1946, pero su aplicación biomédica es mucho más reciente y el empleo de esta tecnología en la práctica clínica se remonta a pocos años atrás.

El principio de la técnica consiste en detectar y, transformar en imagen las variaciones de imanación de los núcleos moleculares de una sustancia bajo la acción de un campo magnético y de una onda electromagnética. Las imágenes obtenidas dependen de múltiples factores, entre ellos la densidad de protones y los tiempos de relajación; estos últimos reflejan el estado dinámico del medio, lo que debe permitir la caracterización histórica y la evaluación del estado funcional de los órganos visualizados.

Los quistes hidatídicos poseen un estado dinámico específico que facilita el diagnóstico diferencial cuando, por ECO o TAC, no se detectan signos característicos de hidatidosis. En comparación con la ECO o el TAC, la RM, delimita mejor las lesiones, define mejor el contenido y permite una evaluación más correcta de las complicaciones, pero es incapaz de detectar pequeños quistes. Teóricamente, valorando las reducciones en el contenido líquido, la RM podría diferenciar entre quistes viables y no viables, pero en la actualidad no es posible tal diferenciación (Ruscalleda 1988; Bernard, De Certaines & Le Jeune 1989; Wojtasck & Teixidor 1989; Claudon, Bessieres, Regent, *et al.* 1990; Marani, Canossi, Nicoli, *et al.* 1990; Marti-Bonmati & Menor 1990; Von Sinner, Rifai, Te Strake & Sieck 1990).

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Dentro del diagnóstico de laboratorio de la hidatidosis podemos distinguir entre una serie de pruebas biológicas generales, habitualmente inespecíficas y con muy escaso valor diagnóstico y, lo que es propiamente el diagnóstico inmunológico de la enfermedad, que será tratado más extensamente.

Entre las pruebas biológicas generales, tan solo la eosinofilia presenta un cierto interés cuando va acompañada de una clínica sugestiva (Torres, Cayla & Corominas 1981; Auffray, Sanchez, Elvira & Dominguez 1984).

El diagnóstico inmunológico de la hidatidosis se basa preferentemente en la detección de la respuesta inmune, ya sea de tipo celular o humoral, que desencadena el hospedador frente a las estructuras antigénicas del parásito. También se ha intentado el diagnóstico mediante la detección de antígenos o inmunocomplejos circulantes (D'Amelio, Pontesilli, Palmisano, *et al.* 1983; Craig 1986a; Schantz 1988; D'Amelio, De Rosa, Pontesilli, *et al.* 1989) pero los resultados son, por el momento, poco alentadores.

La inmunidad celular se ha estudiado mediante la aplicación de técnicas de transformación linfoblástica (Siracusano, Teggi, Quintieri, *et al.* 1988), que en la actualidad se emplean solo a nivel experimental, y mediante la intradermorreacción de Casoni (Casoni 1911; Corominas, Torres & Cayla 1987).

La hipersensibilidad de tipo inmediato (reacción de tipo I), que evidencia la existencia de anticuerpos reagínicos específicos (Ig E específicas), se ha estudiado mediante pruebas de migración de macrófagos, test de transformación linfoblástica, pruebas de degranulación de basófilos (Mir, Garcia de Lomas, Olmos, *et al.* 1982; Pelaez, Sastre, Morales, *et al.* 1988) y pruebas cutáneas como la intradermorreacción de Casoni (Casoni 1911; Corominas, Torres & Cayla 1987).

En la detección de anticuerpos circulantes se han empleado múltiples pruebas serológicas. Las diferencias metodológicas, así como la diferente fuente antigénica empleada, marcan la capacidad de la técnica para detectar las personas afectas de hidatidosis (sensibilidad) y discriminar entre la infestación por *E. granulosus* y la afección por otras parasitosis o patologías (especificidad) (Pozzuoli, Musiani, Arru, *et al.* 1972; Kien, Molet & Ball 1980; Muñoz & Portus 1982; Vicente & Guisantes 1984; Pinel, Fricker, Chumpitazi, *et al.* 1989; Gadea & García-de-Lomas 1991). La falta de sensibilidad y la existencia de reacciones cruzadas han sido y son un problema sin resolver (ver III.C.) y, aunque en algunos casos se ha conseguido incrementar la sensibilidad suele haber sido en detrimento de la especificidad (Lightowlers 1990).

INTRADERMORREACCION DE CASONI

Introducida para el estudio de la reacción cutánea tardía (respuesta celular tipo IV), en la actualidad se emplea para valorar la hipersensibilidad inmediata mediada por anticuerpos reagénicos.

La prueba se basa en la inyección intradérmica de antígenos hidatídicos del contenido quístico, y por tanto esta influenciada por las múltiples variables que pueden suponer la utilización de diferentes lotes antigénicos así como por la concentración y dosificación de estos.

La prueba es bastante sensible pero su valor diagnóstico es dudoso debido a su poca especificidad, habiéndose detectado múltiples falsos positivos en pacientes afectos de otras parasitosis, otras patologías, o incluso pacientes sanos (Schantz, Ortiz-Valqui & Lumbreras 1975; Yarzabal, Schantz & Lopez-Lemes 1975). Aunque se ha intentado incrementar su especificidad empleando antígenos de bajo contenido proteico o antígenos purificados, la prueba no puede emplearse como diagnóstica y tan solo estaría indicada como un test de screening para el estudio de grandes poblaciones en zonas endémicas (Wattre, Cupron, Dessaint & Cupron 1980; Corominas, Torres & Cayla 1987).

FIJACION DEL COMPLEMENTO

Es una de las técnicas inmunodiagnósticas más antiguas y más empleadas, se basa en la sensibilización de hematies de carnero con antígeno hidatídico y la observación de la acción hemolítica del complemento al ser activado por el complejo antígeno-anticuerpo.

Si bien fué la primera técnica serológica introducida en el diagnóstico inmunológico de la hidatidosis (Ghedini 1906), su uso se ha visto restringido debido a la baja sensibilidad y los problemas de inespecificidad que presenta respecto a otras técnicas serológicas (Kagan 1968; Torres-Rodriguez 1976).

PRUEBAS DE AGLUTINACION INDIRECTA

En estas, el antígeno es fijado sobre partículas inertes y la adición de anticuerpos específicos dará lugar a la formación de una malla anticuerpo-antígeno-partícula que se visualizará por la aglutinación de las partículas inertes.

Las pruebas de aglutinación más empleadas han sido las pruebas de aglutinación de látex (AL) y la hemaglutinación indirecta (HAI). Ambas son técnicas de fácil realización y permiten, mediante la dilución de los sueros, un análisis semicuantitativo de los niveles de anticuerpos.

La AL emplea partículas de látex sensibilizadas con antígeno hidatídico. Es bastante sensible (Picardo & Guisantes 1981; Vicente & Guisantes 1984), pero presenta problemas inherentes a la variabilidad de los antígenos empleados, así como de inespecificidad (Rickard 1984; Vicente & Guisantes 1984) por lo que se recomienda su empleo conjuntamente con una técnica de mayor especificidad.

En la HAI se emplean, como partículas inertes, hematies sensibilizados con antígenos hidatídicos. Es una de las técnicas más sensibles empleadas en el diagnóstico rutinario de la hidatidosis, y correctamente estandarizada tiene una buena especificidad

(Kagan 1968; Varela-Diaz, Guisantes, Ricardes, *et al.* 1975; Picardo & Guisantes 1981; Njeruh, Okelo & Gathuma 1989d), aunque se han demostrado reacciones cruzadas con *E. multilocularis*, *T. solium* y otras parasitosis (Vicente & Guisantes 1984; Njeruh, Gathuma, Okelo & Tumboh-Oeri 1989a). Su fácil elaboración y amplia comercialización, la hacen una de las técnicas diagnósticas más empleadas.

MÉTODOS DE PRECIPITACION EN GELES

Los métodos de precipitación en geles se basan en la observación de las bandas de precipitación que se forman cuando antígeno y anticuerpo se combinan en proporciones de equivalencia. Suelen ser técnicas cualitativas con poca resolución, que solo permiten distinguir distintas interacciones antígeno-anticuerpo, aunque su resolución puede incrementarse mediante la separación previa de las diferentes fracciones antigénicas en función de su carga eléctrica (inmunolectroforesis).

La inmunolectroforesis fue aplicada al diagnóstico serológico de la hidatidosis por Chordi y Kagan (1965). Posteriormente, Capron *et al.* (Capron, Vernes & Biguet 1967) describieron por inmunolectroforesis (IEF) la presencia de un arco de precipitación (arco 5) específico para el diagnóstico de la hidatidosis. También se han aplicado al inmunodiagnóstico de la hidatidosis técnicas de doble difusión (DD) (Coltorti & Varela Diaz 1978) y contra-inmunolectroforesis (CIE) (Gentelini & Pinon 1972; Sorice, Delia & Castagnari 1975; Ambroise-Thomas 1984). Se han realizado múltiples variaciones para conseguir incrementar tanto la sensibilidad como la especificidad, entre estas destacar la ELIEDA (*enzyme linked immuno electro diffusion assay*) y ELIDEPA (*enzyme linked immuno double electrophoresis assay*) que revelan los arcos de precipitación con anti-inmunoglobulinas marcadas enzimáticamente (Pinon, Charpentier & Dropsy 1978; Pinel, Fricker, Chumpitazi, *et al.* 1989)

Suelen ser técnicas poco sensibles pero bastante específicas, y en general se acepta que la presencia de un arco 5 por IEF es específica de infestación por *Echinococcus* spp., en especial en aquellas áreas en donde la cisticercosis no es prevalente (Muñoz & Portus 1982; Vicente & Guisantes 1984; Rickard & Lightowlers 1986; Lightowlers 1990).

PRUEBAS INDIRECTAS CON ANTICUERPOS MARCADOS

Las pruebas que emplean anticuerpos marcados para el diagnóstico serológico de la hidatidosis, son múltiples y muy variadas. En todas se emplean anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas conjugados con un marcador, con el fin de detectar la reacción de los anticuerpos específicos del suero con un antígeno que se encuentra fijado a una fase sólida. Suelen ser técnicas cuantificables, y permiten estudiar individualizadamente la clase de inmunoglobulina específica que interviene en la respuesta inmune.

Son técnicas muy sensibles, debido a la amplificación que les supone el empleo de un segundo anticuerpo marcado. Son bastante específicas, permiten el estudio simultáneo de un gran número de muestras y son fácilmente automatizables.

A modo de ejemplo trataremos brevemente aquellas que han tenido mas difusión : inmunofluorescencia indirecta, técnicas de enzimoinmunoensayo y técnicas de radioinmunoensayo.

En la inmunofluorescencia indirecta (IFI) la reacción antígeno-anticuerpo se evidencia por el marcaje de las anti-inmunoglobulinas humanas con fluorocromos. Suele emplear antígenos particulados, generalmente protoscolex enteros o fragmentos, por lo que detecta anticuerpos dirigidos contra antígenos de superficie. Es una técnica bastante sensible, pero que presenta algunos problemas de especificidad (Sanchez, Sanchez & Albala 1977; Auffray, Sanchez & Dominguez 1980; Guisantes & Vicente 1983; Casado, Rodriguez-Caabeiro & Jimenez 1985).

En las técnicas de enzimoimmunoensayo (ELISA) se emplean anti-inmunoglobulinas marcadas enzimáticamente, las cuales dan lugar a compuestos coloreados al reaccionar con un determinado sustrato. Suelen realizarse en placas de microtitulación, sobre las que se fijan antígenos solubles. Correctamente estandarizada es una de las técnicas diagnósticas más sensibles (Guisantes, Rubio & Diaz 1981; Tassi, Dottorini & Baldelli 1982; Mericua, Bout & Capron 1984; Coltorti 1986; Wattal, Malla, Khan & Aarwal 1986; Biava & Kures 1990), pero se han descrito reacciones cruzadas con *T. solium*, *E. multilocularis* y con otras parasitosis (Knobloch, Lederer & Mannweiler 1984). La sensibilidad y especificidad de la ELISA varían en función del antígeno y de las técnicas empleadas para su purificación, incrementándose al máximo cuando se emplean antígenos purificados (Gottstein, Eckert & Fey 1983; Rickard, Honey, Brumley & Mitchell 1984; Hira, Bahr, Shweiki & Behbehani 1990).

El radioimmunoensayo (RIA) emplea conjugados marcados radiactivamente, generalmente con I^{125} . Es comparable en sensibilidad y especificidad a otras técnicas diagnósticas (Musiani, Piantelli, Arru & Pozzuoli 1974; Matossian 1981). Tiene el inconveniente de precisar la manipulación de compuestos radiactivos.

DISTRIBUCION GEOGRAFICA, INCIDENCIA Y PREVALENCIA

La adaptabilidad de *E. granulosus* a diferentes hospedadores y el intercambio de animales domésticos entre Europa y el resto del mundo a hecho posible la distribución mundial de esta parasitosis (Schantz 1984).

La distribución cosmopolita de la hidatidosis presenta variaciones geográficas en cuanto a tasas de incidencia y prevalencia se refiere. Las variaciones en la incidencia de la hidatidosis humana se asocian a factores propios de cada país o región (ambientales, socio-ecológicos o intrínsecos al parásito o el huésped), que modulan la epidemiología de *E. granulosus* en su ciclo biológico doméstico (Gemmell & Lawson 1986a; Gemmell, Lawson & Roberts 1986b; Gemmell 1990).

A nivel mundial, destacan como áreas hiperendémicas: las del cono sur americano, Australia, Africa oriental y toda la cuenca del Mediterráneo incluyendo Iran e Irak (Fig. 11) (Matossian, Rickard & Smyth 1977;

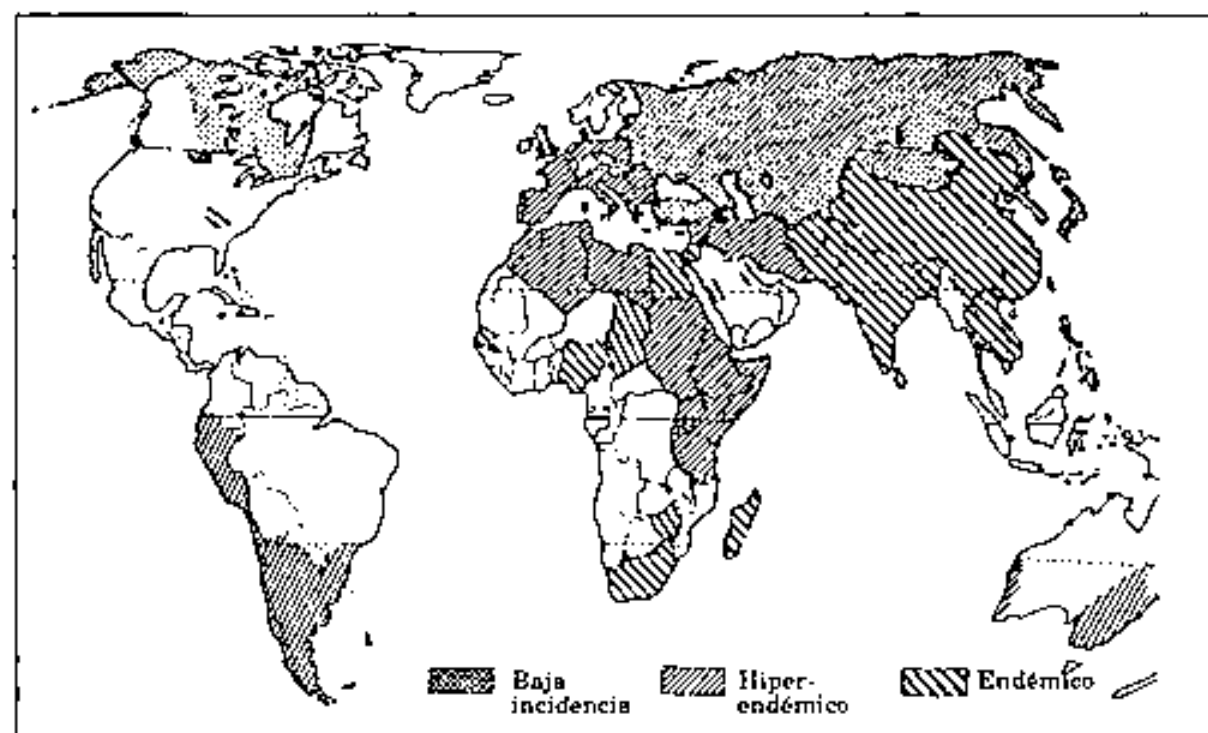


Figura 11. Distribución mundial de la hidatidosis. (según Matossian RM, Rickard MD, Smyth JD. 1977).

PAIS O REGION	REFERENCIA	I.M.A.	PERIODO
Argelia	Larbaoui & Alloula 1981	9	1966-80
Argentina (Chubut)	Varela-Diaz <i>et al.</i> 1983	13.4-75.8	1973-79
Argentina (Rio Negro)	Schantz <i>et al.</i> 1973	143	1969
Australia (Tasmania)	Kelly & Hogarth-Scott 1977	15.1 2.3*	1953-63 1969-71
Bulgaria	Soilev & Boeva 1982	0.7-5.77	1975-79
Chile	Ramirez 1982	6.8	1979
China (Xinjiang/Uyгур)	Chi <i>et al.</i> 1990	43.6	1987
Chipre	Polydorou 1981	12.9 3*	1970 1981
Grecia	Karpathios <i>et al.</i> 1985	9.77	1969-75
Inglaterra	Palmer & Biffin 1987	0.02	1974-83
Italia (Cerdeña)	Conchedda <i>et al.</i> 1985	11.1	1974-81
Kuwait	Shweiki <i>et al.</i> 1990	3.6	1989
Kenya (Turkana)	Nelson 1986	198	
Nueva Zelanda	Burridge <i>et al.</i> 1976 Gemmell 1990	1.8-11.4 0*	1952-71 1970-80
País de Gales	Palmer & Biffin 1987	0.4	1974-83
Tanzania (Maasai)	Macpherson <i>et al.</i> 1989	11	1977-86
Tunez (central)	Behir <i>et al.</i> 1989	19.3	1982-85
Uruguay	Furriel <i>et al.</i> 1973	17.7	1962-71

Tabla I. Tasa de incidencia media anual (I.M.A.) correspondiente a algunos países o regiones

* Tras campaña antihidatídica

Gemmell 1979). En la tabla I se intenta reflejar una panorámica general de la incidencia de la hidatidosis humana a nivel mundial, recopilándose parte de los pocos datos bibliográficos existentes sobre tasas de incidencia correspondientes a algunos países.

ESTADO ACTUAL DE LA HIDATIDOSIS EN ESPAÑA

Aunque la realidad actual de la hidatidosis en España no es bien conocida, numerosas publicaciones, tanto nacionales (Guisantes 1984) como internacionales (Matossian, Rickard & Smyth 1977), coinciden en señalar el territorio español como área hiperendémica.

Si bien no se conoce exactamente la incidencia real de la hidatidosis en nuestro país, los datos disponibles permiten concluir que la hidatidosis tiene importantes repercusiones en salud humana y animal, con considerables pérdidas económicas. Pérdidas económicas debidas mayormente a : la estancia hospitalaria, el absentismo laboral y las perdidas por fallecimiento; pero a las que también deben sumarse las derivadas del parasitismo

de los animales : decomiso de vísceras en los mataderos, menor producción de carne, leche y lana, además de los costes por tratamiento antihelmíntico (Guisantes 1984; Vega, Gimeno Calero, *et al.* 1985; Cayla, Barquet, Corominas, *et al.* 1986b; Hidalgo & Barquet 1987b).

Los estudios existentes en cuanto a incidencia humana de esta parasitosis en el territorio español, muestran una tasa media anual cercana a seis casos por cada 100.000 habitantes y año, lo que corresponde a unos 2000 nuevos casos (Carda-Aparici 1971; Hidalgo & Barquet 1987b). Trabajos sobre morbilidad dan una tasa anual de 117 ingresos por cada 100.000 enfermos hospitalizados (Muñoz, Conthe, Arnalich, *et al.* 1982), y unas tasas de mortalidad específica por 100.000 habitantes que se sitúan entre un máximo de 0,55 y un mínimo de 0,25 según el año estudiado (Felipe, Llopis, Ruiz de la Fuente, *et al.* 1986).

Las tasas de prevalencia e incidencia no presentan, en el territorio español, una distribución uniforme. La mayor incidencia se asocia generalmente a zonas rurales y, suele ser directamente proporcional a la producción de ganado ovino. La densidad de infección por comunidades autónomas es también variable : Castilla-León, Aragón, Extremadura, Rioja, Navarra y Castilla-La Mancha son las comunidades que presentan mayor prevalencia, mientras que Cantabria, Galicia, Murcia, Baleares y Canarias presentan una prevalencia muy baja (Martín, León & Fueyo 1985; Vega, Gimeno, Calero, *et al.* 1985; Casanova, Olavarri & Paga 1986; Cayla, Barquet, Muñoz, *et al.* 1986a; Tomas, Martos, Gomez, *et al.* 1986).

Un estudio retrospectivo a partir de historias clínicas de pacientes diagnosticados de hidatidosis en el período 1977-1981 en 29 hospitales de Cataluña objetivó, en esta comunidad autónoma, una tasa de incidencia media anual de 2,37 por 100.000 habitantes (aunque los mismos autores estiman que la tasa real podría situarse entre el 3 y el 4/100.000). En la distribución por comarcas destacaban por su alta incidencia : Terra Alta (14,5/100.000),

Vall d'Aran (10,3/100.000) y Montsià (6,8/100.000). La población inmigrante presentaba una morbilidad 5,15 veces superior a la observada en la población autóctona (Cayla, Barquet, Muñoz, *et al.* 1986a). La incidencia anual de hidatidosis en la población autóctona catalana durante el período 1977-1981 se estimó de 0,82/100.000 (Cayla, Barquet, Muñoz, *et al.* 1986a). Estudios posteriores ampliados al período 1977-1985 y limitados a la población menor de 20 años mostraron tasas de incidencia de 0,36/100.000 (Barquet, Cayla, Corominas, *et al.* 1989).

ANTIGENOS PARASITARIOS

En la compleja relación que se establece entre el hombre u otros hospedadores intermediarios y *E. granulosus*, interviene de forma relevante la respuesta inmune del hospedador, desencadenada tras la exposición a una serie de moléculas antigénicas propias del parásito.

Durante el desarrollo de la larva hidatídica, desde el periodo post-oncosferral hasta la formación de un quiste maduro, los componentes estructurales del parásito y sus productos de secreción-excreción, son múltiples y potencialmente antigénicos; pero también son múltiples los factores que limitan el número de moléculas que se exponen y los que intervienen modulando la respuesta inmune en el hospedador, además de los factores individuales del hospedador, que pueden condicionar la respuesta inmune frente al parásito (Mitchell 1989; Lightowlers 1990). El conjunto de todos estos factores suponen la respuesta humoral del hospedador, que no tiene porque ser idéntica a la del animal de experimentación, y condicionan la utilidad de las técnicas serológicas empleadas en el diagnóstico de la hidatidosis.

ORIGEN DE LOS ANTIGENOS PARASITARIOS

El líquido hidatídico y los extractos de membranas quísticas y protoscólex componen un mosaico antigénico que clásicamente se ha agrupado según su origen estructural o metabólico :

1) antígenos estructurales, se encuentran formando parte de los protoscólex, de las membranas hidatídicas y de la arena hidatídica. Son antígenos particulados de los que pueden obtenerse extractos solubles.

2) antígenos solubles, están presentes en el líquido hidatídico y pueden considerarse exo-antígenos o antígenos metabólicos, ya que en el líquido hidatídico se recogen y probablemente modifican los productos de secreción y excreción de la larva hidatídica.

De estos antígenos presentes en el líquido hidatídico o los extractos tisulares, algunos se han considerado específicos de *E. granulosus*, y serán tratados más extensamente a continuación.

Asociados a los antígenos parasitarios también se encuentran estructuras antigénicas no exclusivas de *E. granulosus*, pero que son capaces de desencadenar una respuesta inmune inespecífica. Destacan entre estos antígenos, la proteína C reactiva, la fosforil-colina y carbohidratos del tipo P, los cuales poseen actividad antigénica similar a los antígenos P₁ de los hematíes sanguíneos y dan lugar a la producción de importantes cantidades de anticuerpos anti-P, en los pacientes con antígenos eritrocitarios del grupo P₂ (Ben-Ismael, Carme, Niel & Gewtilini 1980).

Así mismo se han evidenciado antígenos comunes a los del hospedador entre los parasitarios, y aunque se ha especulado sobre un posible intento de mimetismo antigénico, parece ser evidente su procedencia extraparasitaria al haberse demostrado la permeabilidad de las membranas quísticas para determinadas proteínas del suero del hospedador, en especial albúmina e inmunoglobulinas (Varela-Diaz & Coltorti 1972; Coltorti & Varela-Diaz 1974; Coltorti & Varela-Diaz 1975; Vidor, Piens, Garin 1987).

La comparación cuantitativa y cualitativa entre los antígenos obtenidos de extractos estructurales y los antígenos solubles, demuestra que los antígenos solubles obtenidos a partir del contenido quístico son más numerosos e inmunogénicos (Torres-Rodríguez 1979). Debido a esta superioridad de los antígenos solubles y a su relativamente sencilla obtención, el líquido hidatídico se ha convertido en la principal fuente de obtención de los antígenos parasitarios empleados en la elaboración de tests diagnósticos (Dottorini & Tassi 1978; Shepherd & McManus 1987a, 1987b), y en especial el de procedencia ovina, pues la concentración de los antígenos mayoritarios se ha observado más elevada en los líquidos hidatídicos de quistes hepáticos fértiles de procedencia ovina o humana (Musiani, Piantelli, Lauriola, *et al.* 1978).

CARACTERIZACION Y NOMENCLATURA DE LOS ANTIGENOS HIDATIDICOS

Como ya se ha mencionado anteriormente, los antígenos empleados habitualmente en el diagnóstico serológico de la hidatidosis se obtienen a partir del líquido hidatídico (Dottorini & Tassi 1978), el cual es una mezcla compleja de moléculas derivadas del parásito y componentes del suero del hospedador (Chordi & Kagan 1965; Coltorti & Varela-Diaz 1974), de entre los primeros tan solo algunos se han demostrado antigénicos y útiles en el diagnóstico serológico de la hidatidosis (Chordi & Kagan 1965; Pozzuoli, Piantelli, Perucci, *et al.* 1975; Shepherd & McManus 1988; Queralt, Madico, Mercader, *et al.* 1989).

Los trabajos publicados sobre las diferentes fracciones antigénicas útiles en el diagnóstico, su caracterización y purificación, así como aquellos que hacen referencia a su nomenclatura son múltiples y complejos. En muchas ocasiones fracciones antigénicas idénticas, se han descrito como diferentes al ser caracterizadas por distinta metodología.

Con el fin de aclarar conceptos y estandarizar nomenclaturas, en una revisión relativamente reciente del tema (Rickard & Lightowers 1986) se aceptan como mayoritarios dos antígenos, el antígeno 5 (Ag5) descrito por Capron *et al.* en 1967 y el antígeno B (Ag B) descrito por Oriol *et al.* en 1971, y se definen las probables sinonimias de estos en función de características comunes de concentración, bandas de precipitación por inmunoelectroforesis, características cromatográficas, sensibilidad a la temperatura, peso molecular, etc..

Trabajos más recientes han descrito nuevas fracciones antigénicas, que aunque probablemente puedan asociarse al Ag 5 o al Ag B, se tratarán separadamente.

Actualmente, las dificultades para obtener antígeno de animales parasitados, así como las reacciones cruzadas que presentan estos antígenos con otras parasitosis, han motivado el inicio de la producción *in vitro* de antígenos hidatídicos, usando técnicas de DNA recombinante.

ANTIGENO 5

El antígeno 5 (Ag 5) es una lipoproteína termolábil que fue descrita en 1967 por Capron *et al.* (Capron, Vernes & Biguet 1967), identificándose con una banda de precipitación característica observada por inmunoelectroforesis y denominada fracción 5 o arco 5, que se correspondería con la banda de precipitación descrita por Chordi y Kagan (1965) como antígeno 4.

En 1971 Oriol *et al.* desarrollaron una sencilla técnica con la que purificar parcialmente los antígenos del líquido hidatídico (Oriol, Williams, Perez-Esandi & Oriol 1971), encontrando dos componentes antigénicos mayoritarios que denominaron antígeno A y antígeno B los cuales se corresponderían con el patrón cromatográfico descrito con posterioridad para los antígenos 4 y 5 de Chordi y Kagan (Pozzuoli, Musiani, Arru, *et al.* 1972).

El peso molecular (PM) descrito para el Ag 5 varía entre 400.000 y 60.000 daltons en función de la técnica de purificación empleada, lo que sugiere una forma polimérica. Por cromatografía se le ha estimado un PM de 400 kDa (Oriol, Williams, Perez-Esandi & Oriol 1971; Pozzuoli, Musiani, Arru, *et al.* 1972, 1974), aunque autores posteriores lo han situado entre 100 y 300 kDa (Dottorini & Tassi 1977). Para Bout *et al.* (Bout, Fruit, Capron 1974) el Ag 5 purificado por cromatografía de afinidad resultó tener un PM de 60 kDa.

Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) se calculó que el Ag 5 tenía un PM de 67 kDa, y que se disociaba por tratamiento con 2-mercaptoetanol (2-Me) en dos subunidades de 47 y 20 kDa (Piantelli, Pozzuoli, Arru & Musiani 1977), aunque estudios posteriores han ido sugiriendo ligeras modificaciones de PM. En 1986 Di Felice *et al.* (Di Felice, Pini, Afferni & Vicari 1986), mediante anticuerpos monoclonales, definen al Ag 5 formado por dos componentes de 66 y 56 kDa, que tras reducción con 2-Me dan lugar a una única banda de 39 kDa. Trabajos más recientes definen al Ag 5 como un heterodímero compuesto por dos

subunidades, una de 37-38 kDa y la otra de 20-24 kDa (variando según los autores) (Shepherd & McManus 1987a, 1988; Lightowers, Liu, Haralambous & Rickard 1989; Chamekh, Facon, Dissous & Capron 1990).

ANTIGENO B

El antígeno B fue descrito en 1971 por Oriol *et al.* (Oriol, Williams, Perez-Esandi & Oriol 1971) como una lipoproteína termoestable, cuya posterior caracterización cromatográfica y físico química (Pozzuoli, Musiani, Arru, *et al.* 1972; Oriol & Oriol 1975) identificó con el antígeno 5 descrito por Chordi y Kagan (Chordi & Kagan 1965).

El Ag B se ha considerado un polímero de unos 150.000 daltons, que en SDS-PAGE se disocia en tres subunidades con un PM comprendido entre 10 y 20 kDa (Piantelli, Pozzuoli, Arru & Musiani 1977; Shepherd & McManus 1987a, 1987b, 1988), aunque una publicación reciente lo considera constituido por diferentes subunidades de aproximadamente 8 kDa, 16 kDa, 24 kDa, ..., posiblemente derivadas de una unidad monomérica de 8 kDa (Lightowers, Liu, Haralambous & Rickard 1989).

OTRAS FRACCIONES ANTIGENICAS

El empleo de diferentes técnicas y metodologías puede motivar pequeñas variaciones en la caracterización y purificación de las fracciones antigénicas, lo que en ocasiones ha llevado a la descripción de una nueva fracción antigénica sin serlo.

El "antígeno 880" (Njeruh, Gathuma, Tumboh-Oeri & Okelo 1989b, 1989c), el antígeno de 8kDa (Maddison, Slemenda, Schantz, *et al.* 1989) y las glucoproteínas de 20 y 48 kDa (Al-Yaman & Knobloch 1989) son algunas de las fracciones antigénicas recientemente descritas, útiles en el diagnóstico serológico de la hidatidosis cuya identidad con el Ag 5 o el Ag B no ha sido probada.

El "antígeno 880" es una lipoproteína termoestable purificada por gel filtración a partir de líquido hidatídico hervido. El antígeno de 8 kDa es una banda de bajo PM, separada por SDS-PAGE, que se ha mostrado muy sensible y específica en inmunoblot. Las glucoproteínas, denominadas "Eg20" y "Eg48", se obtuvieron purificadas del líquido hidatídico por técnicas cromatográficas de interacción hidrofóbica, de intercambio iónico y de gel filtración.

ANTIGENOS RECOMBINANTES

La adaptación de las técnicas de biología molecular para la producción de antígenos recombinantes de *E. granulosus*, puede suponer un gran avance en el diagnóstico serológico de la hidatidosis, y acabar con los problemas de sensibilidad y especificidad que derivaban del empleo de antígenos purificados a partir de líquido hidatídico (Lightowlers 1990).

El retraso con el que se ha aplicado la biología molecular en la hidatidosis, puede derivar de la complejidad de los helmintos, cuyo genoma se ha estimado formado por 10^8 pares de bases, lo que se aproxima más a los 10^9 humanos que a los 10^6 de las bacterias.

Para la expresión de proteínas recombinantes se precisa de una librería de ADN complementario que se prepara de ARN mensajero aislado de protoscolex de *E. granulosus*, para lo cual se suele emplear como vector un bacteriófago lambda (lambda gt11), pues acepta una cadena de DNA más larga (>10 kb). Las proteínas recombinantes suelen identificarse inmunológicamente con sueros hiperinmunes poliespecíficos o anticuerpos monoclonales, una vez identificadas se precisa de una segunda subclonación en un plásmido (pVB1, pVB2), lo que permitirá la obtención de polipéptidos libres de fragmentos bacterianos contaminantes, que se recuperan del espacio periplásmico por medio de un shock osmótico (Lightowlers 1990).

En la actualidad, la obtención de antígenos recombinantes de *Echinococcus* esta todavía en fase experimental, y su aplicación diagnóstica continua presentando problemas de inespecificidad (Lightowers 1990; Selyunin, Ebralide, Lukanidin, *et al.* 1990), aunque ya se han descrito antígenos capaces de detectar la infestación del perro por *E. granulosus* (Gasser, Lightowers & Rickard 1990), antígenos útiles en el diagnóstico de la hidatidosis alveolar (Hemmings & McManus 1989; Muller, Gottstein, Vogel, *et al.* 1989; Muller, Vogel, Gottstein, *et al.* 1989) y se ha logrado la síntesis de péptidos derivados del Ag 5, capaces de reaccionar con antisueros de pacientes afectos de hidatidosis e inhibir su reactividad frente a los antígenos nativos (Facon, Chamekh, Dissous & Capron 1991; Chamekh, Gras-Masse, Bossus, *et al.* 1991).

ESPECIFICIDAD DE LOS ANTIGENOS HIDATIDICOS

Los antígenos hidatídicos, obtenidos preferentemente a partir del contenido quístico, se han empleado para la detección de anticuerpos circulantes en pacientes afectados de hidatidosis. Hasta la actualidad todas las pruebas serológicas evaluadas han mostrado o problemas de sensibilidad y/o han detectado reacciones cruzadas (Muñoz & Portus 1982; Muñoz 1986; Rickard & Lightowlers 1986; Lightowlers 1990).

Las reacciones cruzadas se han presentado básicamente con otras infecciones helmínticas, especialmente entre *E. granulosus*, *E. multilocularis* y *T. solium* (Varela-Díaz, Eckert, Rausch, *et al.* 1977; Gottstein, Eckert & Fey 1983; Marcos, Torres & Amaral 1984; Monzon, Coltorti & Varela-Díaz 1985; Larralde, Montoya, Sciutto, *et al.* 1989), aunque también se han demostrado en otras parasitosis (Maddison, Slemenda, Schantz, *et al.* 1989; Queralt, Madico, Mercader, *et al.* 1989), y se han observado reacciones cruzadas en pacientes afectados de procesos crónicos, generalmente tumoraciones malignas (Dar, Buhidma & Kidwai 1984; Hrzenjak, Paradina, Roginu, *et al.* 1985).

La introducción de técnicas inmunoquímicas, como el inmunoblot, y la elaboración de anticuerpos monoclonales (Craig, Hocking, Mitchell & Rickard 1981; Di Felice, Pini, Afferni & Vicari 1986; Muñoz, Nieto, Gaya & Mazie 1987; Lightowlers, Liu, Haralambous & Rickard 1989) han supuesto un gran avance para el conocimiento y purificación de estos antígenos, pero aunque la sensibilidad ha podido ser incrementada se mantienen los problemas de inespecificidad (Shepherd & McManus 1987a; Lightowlers, Liu, Haralambous & Rickard 1989).

La detección del antígeno 5 por inmunoelectroforesis es poco sensible, pero solo ha presentado inespecificidades con otros cestodos (Varela-Díaz, Eckert, Rausch, *et al.* 1977; Rickard, Lightowlers 1986). Cuando se emplean técnicas más sensibles como el inmunoblot se aprecian reacciones cruzadas en cerca del 80 % de los sueros de pacientes afectados de otras parasitosis y en el 88 % de las cisticercosis (Maddison, Slemenda, Schantz, *et al.* 1989). Parte de estas reacciones inespecíficas pueden

atribuirse a la presencia en el antígeno de epítomos de fosforil-colina que pueden ser detectados por el suero del paciente (Shepherd & McManus 1987a; Lal & Ottesen 1989) o a los anticuerpos anti-P_i previamente mencionados (Ben-Ismaïl, Carme, Niel & Gewtilini 1980).

El Ag B, mucho más abundante pero menos inmunogénico que el Ag 5, se había creído inductor de anticuerpos especie específicos (Shepherd & McManus 1987a). En la actualidad, se cree que las fracciones de más bajo peso molecular (8 kDa) del Ag B son género específicas, pero no especie específicas (Maddison, Slemenda, Schantz, *et al.* 1989; Lightowlers, Liu, Haralambous & Rickard 1989), habiéndose llegado a detectar en el 40 % de los pacientes infestados por *E. multilocularis* (Maddison, Slemenda, Schantz, *et al.* 1989).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

En la era de la biología moderna, en la que la inmunología y la genética molecular tienen un papel predominante, destacan de forma especial los enormes esfuerzos que se están realizando para conseguir desarrollar, mediante ADN recombinante o ingeniería genética, proteínas o fracciones polipeptídicas capaces de ser empleadas en el inmunodiagnóstico serológico o para la obtención de vacunas eficaces; aunque la complejidad y la sofisticación de la interrelación huésped parásito, y la facilidad que algunos parásitos han demostrado tener para evadir la respuesta inmune del hospedador mediante cambios en su mosaico antigénico, son algunos de los grandes problemas con los que se ha encontrado la parasitología médica.

La adaptación de las técnicas de biología molecular para la producción de antígenos recombinantes, puede suponer un gran avance en el diagnóstico serológico, y acabar con los problemas de sensibilidad y especificidad que derivan del empleo de antígenos purificados. Pero, la identificación de los antígenos parasitarios y de sus epítomos, su caracterización y la obtención de anticuerpos específicos, son pasos previos e imprescindibles. Así mismo, la localización de estos antígenos a nivel de las estructuras parasitarias, proporcionara una información muy valiosa sobre su distribución y sus posibles mecanismos de síntesis y liberación; información que, en muchas ocasiones, puede explicar la heterogeneidad de una respuesta inmune en el hospedador y por tanto la dificultad inmunodiagnóstica, así como el poco papel inmunoprotector de sus anticuerpos específicos y por tanto la ineficacia de una posible vacuna.

En base a los argumentos previamente expuestos, y con la intención de aportar nuevos datos que pudiesen ampliar los conocimientos actuales sobre los antígenos de *E. granulosus* y su fisiología, así como mejorar la comprensión de la interrelación huésped parásito en la hidatidosis, los objetivos que nos hemos propuesto en este trabajo son:

Identificar los componentes proteicos del líquido hidatídico, y en particular caracterizar las proteínas inmunogénicas de *E. granulosus* con valor diagnóstico.

OBJETIVOS

Purificar los antígenos parasitarios mayoritarios y obtener antisucros monoespecíficos mediante inmunización experimental.

Caracterizar los antígenos de secreción-excreción liberados durante el cultivo *in vitro*, valorar la rentabilidad de éste como fuente antigénica y estudiar el desarrollo del parásito en dirección quística.

Conocer, a nivel de la microscopía óptica y electrónica, las diferentes estructuras presentes en las formas larvarias de *E. granulosus*.

Localizar a nivel estructural y ultraestructural las fracciones antigénicas mayoritarias de *E. granulosus* y evaluar sus posibles mecanismos de síntesis y liberación.

MATERIAL Y METODOS

I MATERIAL PARASITARIO**A. Obtención del material parasitario**

1. obtención de líquido hidatídico bruto
2. obtención de arena hidatídica
3. obtención de vesículas proliferas y membranas quísticas

B. Procesamiento del líquido hidatídico bruto

1. obtención de líquido hidatídico
 - a. sedimentación de las partículas en suspensión
 - b. concentración por diálisis
 - c. cálculo de la concentración proteica
2. separación de antígenos solubles
 - a. purificación físico-química de los antígenos mayoritarios
 - b. electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfatosódico (SDS-PAGE)
 - (1) geles analíticos
 - (2) geles preparativos
 - c. transferencia a membranas de nitrocelulosa (*electroblotting*)

- C. Procesamiento de la arena hidatídica
 - 1. obtención de protoscólex
 - a. valoración de la viabilidad
 - (1) examen en fresco
 - (2) tinciones vitales
 - b. valoración de la contaminación bacteriana
 - c. tratamiento enzimático
 - 2. mantenimiento de protoscólex *in vitro*
 - a. medio de cultivo
 - b. condiciones de incubación
- D. Procesamiento de las membranas quísticas
 - 1. procesamiento para microscopia óptica
 - a. fijación de los tejidos
 - b. tratamiento de los tejidos
 - (1) inclusión en agar
 - (2) deshidratación, clarificación e impregnación
 - (3) inclusión en parafina
 - c. obtención de cortes histológicos
 - (1) pretratamiento de los portaobjetos
 - (2) obtención de cortes histológicos
 - 2. procesamiento para microscopia electrónica
 - a. fijación de los tejidos
 - b. tratamiento de los tejidos
 - (1) deshidratación
 - (2) impregnación en Lowicryl K4M
 - (3) inclusión y polimerización
 - c. obtención de cortes histológicos

- II CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEINAS INMUNOGENICAS DE *E. granulosus*
 - A. Separación de los componentes proteicos
 - 1. separación electroforética
 - a. geles en gradiente
 - 2. tinciones proteicas en SDS-PAGE
 - a. tinción con azul coomassie
 - b. tinción con nitrato de plata
 - 3. cálculo de la concentración proteica óptima para SDS-PAGE
 - 4. elución de las fracciones protéicas separados por SDS-PAGE
 - B. Identificación de las proteínas inmunogénicas
 - 1. enzimoimmunoensayo sobre nitrocelulosa
 - a. separación electroforética
 - b. transferencia a membranas de nitrocelulosa (*electroblotting*)
 - c. técnicas de enzimoimmunoensayo sobre proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa (*immunoblot*)
 - 2. antisueros empleados
 - a. sueros de pacientes afectos de hidatidosis
 - b. sueros de donantes sanos
 - c. sueros de pacientes con otras parasitosis
 - C. Determinación del peso molecular
 - 1. cálculo de la movilidad relativa
 - a. tinción proteica sobre nitrocelulosa
 - 2. cálculo del peso molecular

III ANTISUEROS

A. Antisueros humanos

B. Obtención de antisueros por inmunización experimental en conejos

1. inmunización

a. antígenos empleados y preparación de inmunógenos

- (1) mezclas proteicas complejas
 - (a) líquido hidatídico
 - (b) antígenos parasitarios mayoritarios
- (2) proteínas parasitarias purificadas por SDS-PAGE
 - (a) antígeno 5
 - (b) antígeno B

b. Pauta de inmunización

2. cinética de producción de anticuerpos y estudio de la especificidad

a. hemaglutinación indirecta

b. inmunoelectroforesis

c. *immunoblot*

3. obtención de los antisueros

4. purificación de los antisueros

a. separación de la fracción inmunoglobulínica

b. cuantificación de inmunoglobulinas

c. cromatografía de afinidad

- (1) preparación y sensibilización de la columna
- (2) cromatografía de afinidad
- (3) regeneración y conservación de la columna

**IV DESARROLLO DE PROTOSCOLEX CULTIVADOS *IN VITRO*,
PRODUCCION DE ANTIGENOS DE SECRECION-EXCRECION**

- A. Desarrollo *in vitro* de *E. granulosus*
- B. Estudio de la producción de antígenos de secreción-excreción
 - 1. obtención de los sobrenadantes
 - 2. preparación de los sobrenadantes
 - a. concentración por ultrafiltración
 - b. concentración por precipitación
 - 3. análisis electroforético e inmunológico del sobrenadante
 - a. SDS-PAGE
 - b. *immunoblot*
 - c. *dot-blot*

V. LOCALIZACION INMUNOHISTOLOGICA DE LAS FRACCIONES ANTIGENICAS**A. estudios estructurales en el metacestodo de *E. granulosus*.**

1. estructura de *E. granulosus* por microscopia óptica
 - a. tinción de hematoxina-cosina
 - b. tinción de May-Grünwald - Giemsa
 - c. tinción tricrómica de Masson
 - d. tinción de Papanicolaou
 - e. tinción del ácido periódico-Schiff (PAS) para glúcidos
 - f. tinción de PAS tras digestión con diastasa
 - g. tinción de azul alcian pH 2.5 para proteoglucanos sulfatados
 - h. tinción de Kinyoun
 - i. tinción argéntica de Gomori-Grocott
 - j. tinción argéntica para fibras de reticulina
2. estructura de *E. granulosus* por microscopia electrónica

- B. inmunolocalización de las fracciones antigénicas**
 - 1. preparaciones histológicas**
 - 2. antisueros empleados**
 - a. conservación de los antisueros**
 - 3. inmunolocalización por microscopia óptica**
 - a. pretratamiento de las secciones histológicas**
 - (1) desparafinado de las secciones**
 - (2) bloqueo de la actividad peroxidásica endógena de los tejidos**
 - (3) desenmascaramiento de los determinantes antigénicos**
 - (4) bloqueo de las uniones inespecíficas**
 - b. incubación con los antisueros**
 - (1) dilución de los antisueros y titulación**
 - (2) tiempo de incubación y marcha de la reacción**
 - c. técnicas inmunoquímicas de detección**
 - (1) inmunoperoxidasa indirecta**
 - (2) avidina-biotina**
 - d. contracoloración y montaje de las preparaciones**
 - e. batería de controles**
 - (1) control negativo**
 - (2) control de conjugado**
 - (3) control de peroxidasa endógena**
 - (4) control de especificidad**
 - f. observación microscópica**

4. inmunolocalización por microscopia electrónica
 - a. pretratamiento de las secciones ultrafinas
 - (1) hidratado de las secciones
 - (2) bloqueo de las uniones inespecíficas
 - b. incubación con los antisueros
 - (1) dilución de los antisueros y titulación
 - (2) tiempo de incubación y marcha de la reacción
 - c. contrastado de las preparaciones
 - d. batería de controles
 - (1) control de conjugado
 - (2) control de especificidad
 - e. observación microscópica

MATERIAL Y METODOS

La preparación de todas las soluciones y tampones que se refieren en este apartado, así como la casa comercial de los reactivos empleados para su composición, quedan detallados en el apéndice.

MATERIAL PARASITARIO

Como material parasitario se ha empleado :

LIQUIDO HIDATIDICO OVINO a fin de caracterizar y purificar los antígenos solubles de interés diagnóstico, y obtener antisueros específicos por inmunización experimental.

ARENA HIDATIDICA OVINA. Los protoscólex se han separado del resto de la arena hidatídica, y se han mantenido *in vitro* para estudiar la producción de antígenos de secreción-excreción.

PROTOSCOLEX, VESICULAS PROLIFERAS Y MEMBRANAS QUISTICAS HUMANAS. Se han empleado como antígenos particulados en la inmunolocalización de las fracciones antigénicas por microscopia óptica y electrónica.

OBTENCION DEL MATERIAL PARASITARIO

OBTENCION DEL LIQUIDO HIDATIDICO BRUTO

El líquido hidatídico bruto se obtiene de quistes hidatídicos de ganado ovino mayor sacrificado en el matadero Municipal de Zaragoza.

Todas aquellas vísceras en las que se evidencia la presencia de formaciones quísticas se separan de la cadena de desguace y se recogen para su manipulación.

Tras la localización macroscópica de las formaciones quísticas (Fig 12 y 13) se seleccionan preferentemente aquellas de mayor tamaño, se esteriliza su superficie externa con una solución antiséptica a base de povidona yodada al 1% (Topionic; RIUS) y se recoge el contenido quístico por punción con aguja y jeringa estéril. Dicho contenido quístico, se guarda de forma individualizada en tubos estériles de 50 ml con fondo cónico (PACISA), se transporta en contenedores hipotérmicos hasta el laboratorio y se conserva a 4°C hasta su posterior procesamiento, que nunca se retrasará más de 18-24 horas.

Todos aquellos quistes con evidencia clara de sobreinfección o calcificados, son despreciados.

OBTENCION DE ARENA HIDATIDICA

La arena hidatídica, se recupera del líquido hidatídico bruto o se recoge directamente del interior de la cavidad quística.

En el primer caso el proceso se realiza en el laboratorio.

El líquido hidatídico bruto se centrifuga a 1.000-1.500 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C (centrifuga: KOKUSAN H-103N) y se recoge el sedimento que se procesa de inmediato.



Figura 12. Hidatidosis hepática - hígado ovino con múltiples quistes uniloculares de diferentes tamaños.



Figura 13. Hidatidosis pulmonar - pulmón ovino con múltiples quistes uniloculares de diferentes tamaños.

En algunos de los quistes fértiles de mayor tamaño se pudo obtener la arena hidatídica en el mismo matadero. En el proceso de obtención se siguen las recomendaciones dadas por Smyth (1967, 1985).

Una vez extraída la mayor parte del contenido líquido de los quistes, éstos son abiertos con material quirúrgico en condiciones de máxima asepsia y los restos de arena hidatídica recogidos con pipeta Pasteur y conservados hasta su posterior procesamiento en medio de cultivo celular (ver : I.C.2.a.).

OBTENCION DE VESICULAS PROLIFERAS Y MEMBRANAS QUISTICAS

Las vesículas prolíferas y las membranas quísticas se obtienen de quistes hidatídicos fértiles de procedencia humana extirpados quirúrgicamente en los Servicios de Cirugía del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona (HSCSP).

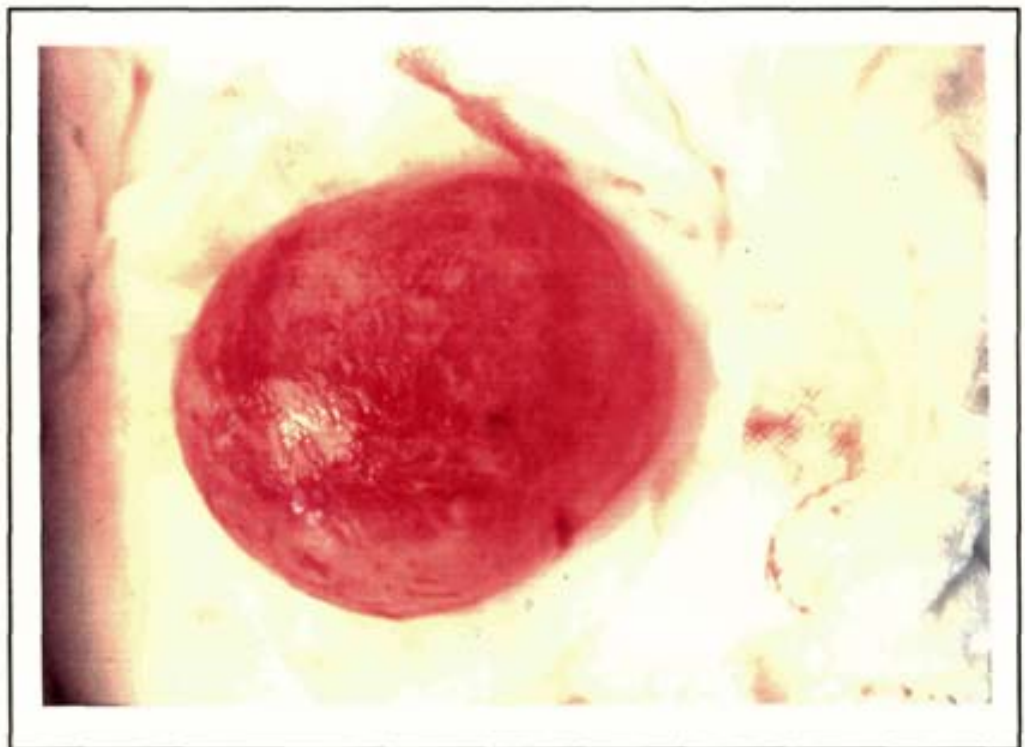


Figura 14. Quiste hidatídico pulmonar de procedencia humana, extirpado quirúrgicamente en el servicio de cirugía torácica del HSCSP.

Tras la extracción quirúrgica de la formación quística (Fig 14) la pieza es inmediatamente remitida al Servicio de Microbiología y procesada.

Siguiendo las mismas pautas antes descritas, se extrae el líquido hidatídico y la arena hidatídica.

Por microscopia, se comprueba la presencia de vesículas prolíferas y la viabilidad de los protozóos (ver : I.C.1.a.).

Se seleccionan los quistes fértiles sanos y se toma una porción representativa de cada estructura parasitaria, que se introduce inmediatamente en las soluciones fijadoras apropiadas (ver : I.D.1.a.).

PROCESAMIENTO DEL LIQUIDO HIDATIDICO BRUTO

El líquido hidatídico bruto se procesa para obtener un líquido hidatídico libre de partículas en suspensión, a partir del cual se obtienen, purificados, los antígenos parasitarios solubles.

OBTENCION DE LIQUIDO HIDATIDICO

El líquido hidatídico bruto se purifica eliminando, por centrifugación, las partículas en suspensión. Posteriormente se concentra por diálisis.

Las diferentes alícuotas de líquido hidatídico, una vez purificadas y concentradas, se unifican en un *pool* único, y se conservan a -20°C hasta su utilización.

SEDIMENTACION DE LAS PARTICULAS EN SUSPENSION

Las partículas en suspensión se sedimentan mediante dos centrifugaciones consecutivas: la primera centrifugación consigue separar las partículas de mayor tamaño que componen la arena hidatídica y que se procesan independientemente (ver : I.C.). La segunda consigue sedimentar el resto de partículas, que son desechadas.

Centrifugación a 1.000-1.500 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C (centrífuga: KOKUSAN H-103N).

Centrifugación a 10.000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C (centrífuga: KONTRON analytical, rotor de ángulo fijo: A8.24, compensación: +2)

CONCENTRACION POR DIALISIS

El líquido hidatídico purificado se concentra aproximadamente diez veces respecto al volumen inicial.

Se efectúa una diálisis frente a polietilén glicol 20.000 (PEG 20.000; FLUKA), en membranas tubulares de celulosa (Dialysis Tubing-Visking size 8.32/32", MEDICELL INTERNATIONAL LTD.).

CALCULO DE LA CONCENTRACION PROTEICA

La concentración proteica del líquido hidatídico puro, antes y después de concentrar, se calcula por el método de Bradford (Bradford 1976).

La absorbancia del complejo proteína-colorante (Protein Assay Dye Reagent, BIO-RAD) se lee a 595 nm en espectrofotómetro (Uvikon 860; KONTRON), y la concentración proteica se calcula según una recta de calibración elaborada con seroalbúmina bovina (BSA: albumin fraction V, MERCK).

SEPARACION DE ANTIGENOS SOLUBLES

Por técnicas físico-químicas se consigue una primera separación de los antígenos lipoproteicos de *E. granulosus* respecto a la mayor parte de las proteínas séricas del hospedador que contaminan la mezcla antigénica (fundamentalmente albúmina e inmunoglobulinas).

En una segunda etapa, la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) separa, en función de su peso molecular, los diferentes polipéptidos que componen la mezcla antigénica purificada.

Finalmente, dichos componentes polipeptídicos, son visualizados por tinción con colorantes proteicos, o transferidos a membranas de nitrocelulosa (*Electroblotting*) sobre las que se podrán aplicar técnicas de enzimoinmunoensayo (*Immunoblot*).

PURIFICACION FISICO-QUIMICA DE LOS ANTIGENOS MAYORITARIOS

En el procedimiento se sigue la metodología descrita por Oriol *et al.* (Oriol, Williams, Perez-Esandi & Oriol 1971) (Tabla II), fundamentada en el conocimiento del punto isoeléctrico de los antígenos mayoritarios de *E. granulosus* y las diferencias de solubilidad entre estos y las proteínas del hospedador.

El líquido hidatídico purificado se dializa durante 36 horas frente a tampón acetato 0.005 M, pH 5, a 4°C y en agitación. En el proceso, la albúmina y las pseudoglobulinas quedan en suspensión y la mayoría del antígeno parasitario precipita junto con las inmunoglobulinas. El precipitado se recupera tras centrifugación a 20.000 r.p.m. durante una hora a 4°C (centrífuga: KONTRON analytical, rotor de ángulo fijo: AB.24, compensación: +2) y se resuspende en tampón fosfato 0.2M, pH 8 (PB).

Los antígenos parasitarios se separan de las inmunoglobulinas, por precipitación de estas últimas en una solución de sulfato de amonio [$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$] al 40 %: El precipitado resuspendido en PB es mezclado (v/v) con una solución de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 80% y dejado a temperatura ambiente en agitación. Tras una hora de reacción, las inmunoglobulinas precipitadas son separadas por centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 15 minutos (centrífuga: Eppendorf 5414S), y los antígenos parasitarios son recuperados en el sobrenadante. La eliminación del $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ del sobrenadante se realiza por diálisis en tampón PB hasta que no se detectan trazas de sulfato (SO_4^{2-}) en el líquido de diálisis al añadir una solución saturada de cloruro bórico ($\text{Cl}_2\text{Ba} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (v/v).

La concentración proteica de cada una de las fracciones obtenidas se calcula por el método de Bradford (I.B.1.c.) y se conservan a -20°C hasta su posterior utilización.

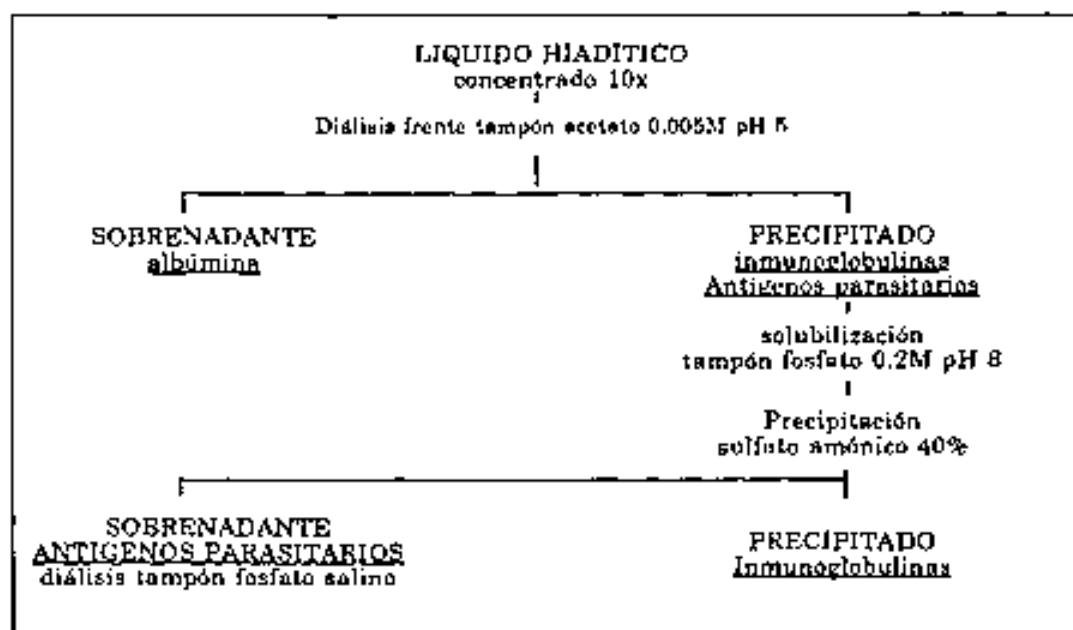


TABLA II: Purificación físico-química de los antígenos mayoritarios de *E. granulosus* según Oriol et al. 1971.

*ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA
EN PRESENCIA DE DODECIL SULFATO SODICO (SDS-
PAGE)*

La separación electroforética de los componentes polipeptídicos de la mezcla antigénica se realiza adaptando la metodología de tampones discontinuos descrita por Laemmli (1970).

Todo el proceso de montaje de geles y separación electroforética, se realiza con el sistema de electroforesis vertical Protean II (BIO-RAD), conectado a un alimentador para electroforesis (ATOM 502).

En la preparación de los geles, se parte de una solución madre de acrilamida-bisacrilamida (BIO-RAD) del 40 % (p/v), con un porcentaje de bisacrilamida (N,N'-methylene-bis-acrylamide) del 2.6%, que es diluida convenientemente en agua bidestilada y el pertinente tampón (ver Tabla III).

La polimerización química de los geles, se realiza a temperatura ambiente, por la adición de un 0.1% (v/v) de TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylene-diamine) como catalizador, y un 0.1% (p/v) de persulfato de amonio como iniciador.

Como tampón de electroforesis se emplea Tris-HCl (SIGMA) 0.025M, glicina 0.192M, SDS 0.1%, pH 8.3.

La mezcla antigénica, diluida convenientemente en tampón fosfato salino 0.2M pH 7.2 (PBS), es mezclada (v/v) en tampón de muestra 2x, para obtener una dilución final : Tris 0.0625M, EDTA-Na (Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt) 0.001M, pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.0025%. Las muestras procesadas en condiciones reductoras se tratan del mismo modo pero adicionando un 5% de 2-mercaptoetanol y sometiéndolas a un baño María en ebullición durante 10 minutos.

La migración electroforética se realiza a potencial constante (100 V), y se da por finalizada cuando el frente de migración alcanza el último centímetro del gel de separación (aproximadamente 10 horas).

	GEL APILADOR		GEL SEPARADOR			
	Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 0.1%		Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8, SDS 0.1%			
			5%	8%	12%	20%
Acrilamida bisacrilamida 40%	12.6%	12.6%	20%	30%	50%	
Tampón Tris-HCl 1.5M pH 8.8 SDS 0.4%	-	25%	25%	25%	25%	
Tampón Tris-HCl 0.5M pH 6.8 SDS 0.4%	25%	-	-	-	-	
Agua destilada	61.4%	61.4%	53.9%	43.9%	21.9%	
TEMED	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	
Persulfato amónico 10%	1%	1%	1%	1%	1%	

TABLA III. Preparación de los geles de poliacrilamida según el sistema de tampones discontinuos de Laemmli.

Geles analíticos : se emplean geles de poliacrilamida de 0.75 x 160 x 200 mm, en los que pueden sembrarse de una a diez muestras simultáneamente. Suelen emplearse para el estudio analítico de una muestra proteica, generalmente mediante tinción.

Geles preparativos : son geles con mayor espesor de poliacrilamida (1.5 x 160 x 200 mm), por lo que aceptan un mayor volumen de muestra y una mayor cantidad de proteína. Suele sembrarse una sola muestra por gel y generalmente se emplean para separar proteínas que serán posteriormente transferidas a membranas.

TRANSFERENCIA A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA (ELECTROBLOTTING)

Los polipéptidos separados por SDS-PAGE, son transferidos a membranas de nitrocelulosa por electroelución, según el procedimiento descrito por Towbin *et al.* (Towbin, Staehelin & Gordon 1979).

El gel y la membrana de nitrocelulosa (NC) (MILLIPORE, 0.45 μ m) se equilibran durante 30 min. por inmersión en tampón de transferencia (Tris 0.025M, glicina 0.192M, metanol 20%, pH 8.4), se ponen en íntimo contacto en el interior del "cassette" de transferencia (Fig 15), y se sumergen en tampón de transferencia en la cubeta de electroforesis (Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, BIO-RAD).

La electroelución se consigue con una fuente de alto voltaje (Power Supply 250/2.5, BIO-RAD) que somete al gel a un campo eléctrico perpendicular de 70 V durante 4h.

Una vez transferidas, las membranas de NC se conservan envueltas en papel de aluminio y congeladas a -20°C .

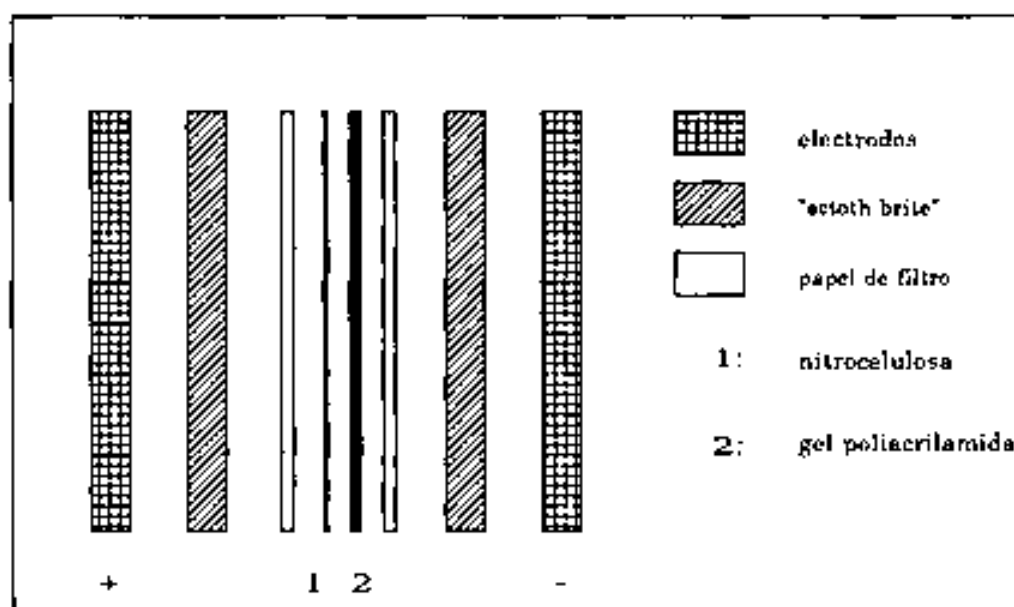


Figura 15. Esquema del montaje del "cassette" de transferencia empleado en la electroelución a membranas de nitrocelulosa de las proteínas separadas por SDS-PAGE.

PROCESAMIENTO DE LA ARENA HIDATIDICA

La arena hidatídica, de procedencia ovina, se emplea en la obtención de protoscólex, que serán mantenidos *in vitro* con el fin de estudiar su desarrollo y valorar la producción de antígenos de secreción-excreción.

OBTENCION DE PROTOSCOLEX

Para la obtención de protoscólex se seleccionan aquellas muestras de arena hidatídica ricas en formas parasitarias viables y con ausencia de contaminación bacteriana evidente.

Las membranas quísticas y los organismos muertos son digeridos por tratamientos enzimáticos.

VALORACION DE LA VIABILIDAD

La viabilidad de los protoscólex se valora microscópicamente (microscopio: Laborlux 11, LEITZ; aumentos: 40 x).

Examen en fresco. Se reconocen como viables las formas parasitarias móviles y/o aquellas en las que se observa actividad vibrátil a nivel de las células flamíferas.

Tinciones vitales. Los protoscólex viables, no se tiñen con colorantes vitales.

Se prepara una solución acuosa de eosina al 0.01%. Sobre un portaobjetos, se añaden unas gotas de la solución a una muestra de la arena hidatídica. Se deja actuar 5 min. y se observa al microscopio.

VALORACION DE LA CONTAMINACION BACTERIANA

La contaminación bacteriana de las muestras se valora mediante el examen microscópico (microscopio: Laborlux 11, LEITZ; aumentos: 100 x) después de una tinción de Gram (Bartholomew 1962).

TRATAMIENTO ENZIMATICO

Las muestras previamente seleccionadas, son lavadas, diluidas en PBS, y sometidas seguidamente a un proceso de digestión enzimática con tripsina.

La arena hidatídica lavada en PBS, y separada por centrifugación (ver : I.A.2.), se somete a un proceso de digestión enzimática en una solución de PBS-tripsina 0.25% (Tripsina (1:250)), a temperatura ambiente, durante 30 min. con agitación intermitente.

Los protoscolex viables liberados, se recuperan por centrifugación (centrifuga: KOKUSAN H-103N), y se valora microscópicamente el efecto enzimático, repitiéndose el proceso en caso de ser insuficiente. Finalmente, se lavan en PBS y se introducen en medio de cultivo.

MANTENIMIENTO DE PROTOSCOLEX IN VITRO

Los protoscolex se mantienen en cultivo en frascos estériles (Cell Culture Flasks, 70 ml; COSTAR) con 10 ml de medio.

MEDIO DE CULTIVO

Se emplea Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) sin suplementar con suero bovino fetal.

La preparación del medio se realiza en cámara estéril.

En su preparación se emplea MEM 10x (Minimum Essential Medium Eagle (Modified) with Earle's Salts), que es suplementado con aminoácidos no esenciales y un 2% de L-glutamina.

El medio se tampona con una solución acuosa de HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazina-N'-2-ethanesulfonic acid), y se ajusta el pH a 7.4 con una solución de ClH 1N.

Con la adición de soluciones antibióticas se consigue una concentración final de 400 U.I./ml de penicilina, 400 µg/ml de estreptomina y 1.5 µg/ml de Neomicina.

CONDICIONES DE INCUBACION

Los frascos de cultivo se mantienen en estufa (HERAEUS) a 37°C.

La periodicidad de la renovación del medio de cultivo está en función de la acidificación detectada por el cambio de coloración en el indicador de pH.

PROCESAMIENTO DE LAS MEMBRANAS QUISTICAS

Las vesículas proliferas y membranas quísticas de procedencia humana, son estudiadas histológicamente por técnicas microscópicas, observándose su estructura y empleándose como antígenos particulados en los estudios de inmunolocalización.

En las dos técnicas microscópicas empleadas (microscopía óptica: MO y microscopía electrónica: ME) los principios de procesamiento del material son idénticos (fijación de los tejidos, tratamiento de los tejidos y obtención de cortes), pero la metodología empleada varía y debe de ser tratada individualmente.

PROCESAMIENTO PARA MICROSCOPIA OPTICA

FIJACION DE LOS TEJIDOS

El proceso de fijación se inicia inmediatamente después de la extracción del material parasitario por inmersión en una solución de formalina tamponada.

A partir de una solución acuosa de formaldehído al 35-40%, se prepara una solución de formalina al 10% en tampón fosfato 0.1M, pH 7.3.

El material parasitario se fragmenta en trozos de tamaño no superior a 10 x 10 x 4 mm, y se sumerge en un volumen de solución fijadora diez veces superior.

El proceso de fijado se efectúa durante 18-24 horas y a temperatura ambiente.

TRATAMIENTO DE LOS TEJIDOS

Una vez finalizado el proceso de fijación, los tejidos se someten a un proceso de deshidratación y clarificado que permite sustituir el agua por parafina, con el fin de conseguir un bloque firme del que poder obtener cortes histológicos.

Inclusión en agar. El material parasitario de menor tamaño (vesículas prolíferas y protoscólex) debe ser previamente compactado para facilitar su manipulación y posterior procesamiento.

Las vesículas prolíferas y protoscólex fijados en formalina, se separan por centrifugación (10 min. 1.000-1500 r.p.m.).

Se prepara una solución de agar al 5%, se deja enfriar sin que llegue a solidificar, se vierte sobre el sedimento y se deja solidificar en agitación obteniéndose finalmente un bloque compacto que se fragmenta en cubos de 1 cm³.

Deshidratación, clarificación e impregnación. Todo el proceso de deshidratación en concentraciones crecientes de alcohol, clarificación en xileno e impregnación en parafina (Paraplast plus; IZASA) se realiza al vacío, mediante un procesador automático de tejidos (Vacuum Infiltratio Processor, VIP 2.000, Tissue-Tek; MILES SCIENTIFIC), a una temperatura máxima de 60°C.

Inclusión en parafina. El material parasitario embebido en parafina, es incluido en bloques de parafina de los que se podrán obtener cortes histológicos.

El proceso de inclusión se realiza con parafina fundida a 60°C, sobre una plataforma caliente (Tissue Embedding Console System, Tissue-Tek; MILES SCIENTIFIC), dejándose enfriar el bloque a temperatura ambiente.

OBTENCION DE CORTES HISTOLOGICOS

Tras la inclusión de el material parasitario, se procede a la obtención de cortes histológicos que son montados sobre portaobjetos pretratados con soluciones adherentes.

Pretratamiento de los portaobjetos. Los portaobjetos son tratados con una solución de gelatina alumbre de cromo (Bourne JA. 1983) para facilitar la adhesión del tejido y evitar el que éste se desprenda con tratamientos enzimáticos.

En agua hirviendo se prepara una solución al 3% de gelatina, se deja enfriar a temperatura ambiente, se añade cromo al 0.05% y se guarda en nevera un máximo de 24 horas.

Los portaobjetos, desengrasados previamente en alcohol de 96° se sumergen 2-3 min. en la solución de gelatina-cromo, se dejan secar y se guardan protegidos del polvo hasta ser empleados.

Obtención de cortes histológicos. El material parasitario incluido en bloques de parafina, se secciona en finas láminas de 4-5 μ m de grosor mediante microtomo (LEITZ 1512).

Antes de iniciar la obtención de cortes, los bloques de parafina se congelan a -20°C.

Las láminas obtenidas se extienden sobre un baño de flotación (Electric Tissue Float; LIPSHAW) con agua a 60°C, se montan sobre los portaobjetos pretratados, se dejan secar durante 24-48 horas en estufa a 37°C, y se conservan a temperatura ambiente protegidas del polvo hasta su posterior utilización.

PROCESAMIENTO PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA

FIJACION DE LOS TEJIDOS

Con el fin de preservar al máximo la antigenicidad al igual que la estructura, se empleó como fijador una solución de paraformaldehído y glutaraldehído (Karnovsky MJ, 1965).

La fijación de los tejidos se consigue por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.3% en PBS 0.1M pH 7.3, durante dos horas a 4°C.

Tras la fijación, se lavan las muestras en PBS (3 x 16 min), se bloquean los grupos aldehídos libres por inmersión en cloruro amónico 50mM durante 30-60 min, y se vuelve a lavar en PBS (3 x 16 min).

TRATAMIENTO DE LOS TEJIDOS

Una vez finalizado el proceso de fijación los tejidos son deshidratados e impregnados con una resina de tipo metracrilato (Lowicryl® K4M), la cual al polimerizar dará lugar a un bloque firme del que se obtienen los cortes histológicos.

Deshidratación. El proceso de deshidratación se realiza en etanol a concentraciones crecientes y a baja temperatura, siguiendo el protocolo de Carlemalm y Roth (Roth, Bendayan, Carlemalm, *et al.* 1981; Carlemalm, Villiger, Hobot, *et al.* 1985) (Tabla IV).

Etanol	Temperatura	Tiempo
30%	0°C	30 min
50%	-20°C	60 min
70%	-35°C	60 min
95%	-35°C	60 min
100%	-35°C	60 min
100%	-35°C	60 min

TABLA IV. Protocolo de deshidratación para inclusión con Lowicryl

Impregnación en Lowicryl® K4M. En el proceso de impregnación, el etanol del material previamente deshidratado es sustituido progresivamente por Lowicryl.

La preparación de la resina de Lowicryl, se efectúa bajo campana y con nitrógeno fluyente para evitar la presencia de oxígeno que inhibe la polimerización.

La proporción de *crosslinker* respecto al monómero es del 13.5%. El iniciador se añade a la mezcla en una proporción del 0.5%.

El proceso de impregnación se realiza por inmersión: primero en dos baños de resina-etanol de 1 hora cada uno (relación 1/1 en la primera hora y 2/1 en la segunda) y finalmente en tres baños de resina pura (una hora, doce horas y ocho horas respectivamente). Todo el proceso se realiza a -35°C .

Inclusión y polimerización. Finalizada la impregnación, las muestras serán incluidas en resina, y se obtendrán los bloques por la polimerización de esta.

Para la obtención de los bloques se emplean cápsulas de gelatina (POLARON) completamente llenas de resina pre-enfriada a -35°C , a las cuales se transfiere la muestra.

La polimerización se consigue por efecto de la radiación ultravioleta ($\lambda=360\text{ nm}$) (ATOM), durante 72 horas a -35°C .

Los bloques se conservan a temperatura ambiente libres de humedad .

OBTENCION DE CORTES HISTOLOGICOS

El material parasitario incluido en bloques polimerizados de Lowicryl* K4M se secciona con un ultramicrotomo Ultracut E, Reichert para obtener cortes ultrafinos de unos 60 nm de espesor.

Para la obtención de los cortes se emplean cuchillos de vidrio o diamante.

Debe evitarse que el agua del receptáculo de la cuchilla moje ésta, pues la hidratación de la resina, debido a su gran hidrofilia, dificultará la posterior obtención de buenas secciones.

Las secciones se recogen del agua del receptáculo de la cuchilla lo antes posible, y se montan sobre rejillas de oro. Se emplean rejillas de 200 mesh, recubiertas con una membrana de formvar, sobre la cual se vaporiza una delgada capa de carbono para mejorar sus características físicas de resistencia frente al haz electrónico.

CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS INMUNOGENICAS DE *E. granulosus*

Los distintos componentes antigénicos del líquido hidatídico son separados electroforéticamente y visualizados tras tinción proteica adecuada.

La identificación de las proteínas inmunogénicas de *E. granulosus*, se realiza estudiando la reactividad que presentan las diferentes fracciones, frente a sueros de pacientes afectados de hidatidosis.

Una vez identificadas, se caracterizarán en función de su peso molecular.

SEPARACION DE LOS COMPONENTES PROTEICOS

SEPARACION ELECTROFORETICA

Los componentes polipeptídicos de la mezcla antigénica se separan mediante SDS-PAGE según la metodología antes descrita (ver: I.B.).

Como mezcla antigénica se emplea el líquido hidatídico y la fracción antigénica purificada por precipitación a baja fuerza iónica.

Las muestras son previamente dializadas frente a PBS, y procesadas en condiciones reductoras y no reductoras.

La separación se realiza en geles preparativos o analíticos, empleando geles con un porcentaje de poliacrilamida del 8% y 12%, así como geles con gradiente.

GELRS EN GRADIENTE.

Se emplean geles con gradiente lineal de poliacrilamida entre el 5 y el 20%.

La formación del gradiente de poliacrilamida, se consigue por la dilución progresiva de una solución de poliacrilamida al 5% en otra al 20% (ver Tabla III).

La solución de poliacrilamida al 20%, es conectada con la solución al 5% a través de un sistema de vasos comunicantes (Gradient Former 385; BIO-RAD). Un sistema de agitación (Agimatic-N; SELECTA) permite la mezcla de ambas soluciones y la dilución progresiva de la más concentrada a medida que es drenada por la acción de una bomba peristáltica a flujo constante (Peristaltic Pump P-1; PHARMACIA) (Fig 16).

TINCIONES PROTEICAS EN SDS-PAGE

Las fracciones polipeptídicas separadas en los geles analíticos, se evidencian por tinción con colorantes proteicos.

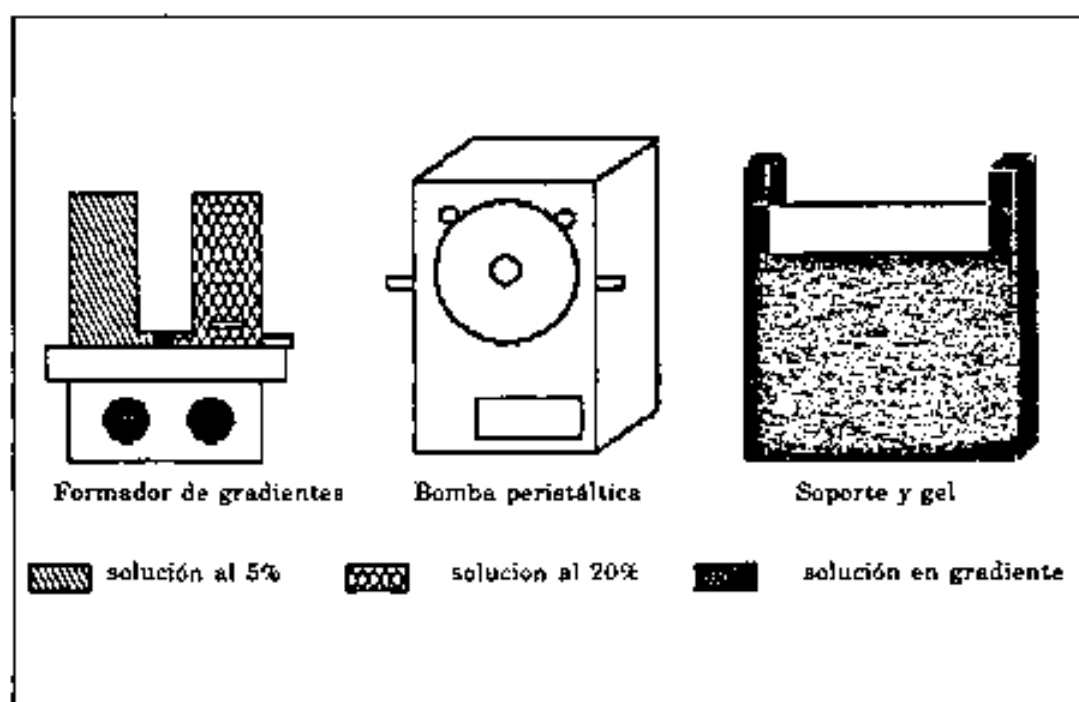


Figura 16. Preparación de geles de poliacrilamida con gradiente lineal del 5 al 20%.

Una vez teñidas, los geles son secados por calor en un secador de geles (Slab Dryer 443, BIO-RAD) conectado a una bomba de vacío (MILLIPORE 230 V/50 Hz).

TINCIÓN CON AZUL COOMASSIE

La tinción con azul Coomassie (CBB R-250) (Ouchterlony O, Nilson 1973) es la más difundida, y la que se ha empleado de forma preferente en toda la experiencia.

Su límite de detección es de aproximadamente 100 ng/mm² (Tijssen 1985). La intensidad de tinción es proporcional a la concentración proteica.

La tinción se realiza por inmersión durante 18 horas en una solución de CBB R-250 al 0.2% en metanol-agua-ácido acético glacial en la proporción 4.5/4.5/1, seguida de una decoloración con metanol-agua-ácido acético glacial 2.5/6.6/0.8.

TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA

La tinción con nitrato de plata es más sensible, con un límite de detección de 0.01-1 ng/mm² (Tijssen 1985), pero no es cuantitativa y existen proteínas que no son teñidas (Goldman, Sedman & Ebert 1981; Morrissey 1981; Heukeshoven & Dernick 1985). En esta experiencia se siguió la metodología de Heukeshoven y Dernick (1985).

Se sumerge el gel durante 30 min. en una solución de etanol al 45%, ácido acético 12%, y seguidamente se lava en etanol al 10% (3 x 10 min) y agua destilada (3 x 10 min). Posteriormente se sumerge el gel 30 min. en la solución argéntica al 0.1%, se lava con agua destilada, se revela por inmersión en tres baños de solución reveladora (Na₂CO₃ 2.5%, HCHO 0.02%) de 10", 30-60", 5-10 min. respectivamente, y se elimina la coloración de fondo por inmersión durante 30" en reductor de Farmer al 0.5%.

CÁLCULO DE LA CONCENTRACION PROTEICA OPTIMA PARA SDS-PAGE

La separación electroforética de diferentes concentraciones proteicas de una misma muestra en un gel de poliacrilamida analítico, nos permite seleccionar la concentración óptima de trabajo, siendo aquella que consigue la máxima resolución entre las diferentes bandas, con la mínima perdida posible de bandas correspondientes a proteínas minoritarias.

La proteína total por muestra, se calcula en geles analíticos con capacidad para 10 muestras diferentes. En caso de geles analíticos en los que se siembra una única muestra la proteína total presente en ésta es $\times 15x$. Cuando se emplean geles preparativos la proteína total sembrada es en cualquiera de los dos casos el doble.

Todas las cuantificaciones proteicas se realizan por el método de Bradford (ver : I.B.1.c.).

ELUCION DE LAS FRACCIONES PROTEICAS SEPARADAS POR SDS-PAGE

Los componentes polipeptídicos del líquido hidatídico son separados por SDS-PAGE en geles preparativos al 8% y las diferentes bandas proteicas son localizadas mediante la tinción, de ambos extremos del gel, con CBB R-250.

Seguidamente la zona del gel correspondiente a las diferentes bandas es recortada y homogenizada en tampón Tris-salino, recuperandose la fracción proteica tras centrifugación.

Homogenizar la porción de gel recortada en 3 ml de tampón Tris 20mM-ClNa 0.13M, centrifugar a 15.000 r.p.m. durante 30 min. y recuperar el sobrenadante.

Repetir el proceso tres veces, homogenizar los diferentes sobrenadantes, calcular la concentración proteica y concentrar convenientemente por ultrafiltración (Concentrador Minicon B₁₀ ; AMICON).

Las proteínas correspondientes a las diferentes bandas proteicas, una vez eluidas y concentradas, serán tratadas con 2-Me y separadas nuevamente en geles de poliacrilamida con el fin de conocer su perfil electroforético en condiciones reductoras.

IDENTIFICACION DE LAS PROTEINAS INMUNOGENICAS

Tras la separación electroforética, la transferencia a membranas de nitrocelulosa permite, mediante la aplicación de técnicas de enzimo-inmuno-ensayo (EIA), la identificación de las proteínas inmunogénicas con interés diagnóstico.

ENZIMOINMUNOENSAYO SOBRE NITROCELULOSA (INMUNOBLOT)

SEPARACION ELECTROFORETICA

Se emplean geles preparativos (ver : I.B.2.b.(2)), en los que se separa líquido hidatídico purificado, sembrándose un volumen de muestra equivalente a 0.5 mg de proteína total).

TRANSFERENCIA A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA (ELECTROBLOTTING)

Los polipéptidos separados por SDS-PAGE, son transferidos a membranas de nitrocelulosa por electroelución, según el procedimiento descrito previamente (ver : I.B.2.c.).

TECNICAS DE ENZIMOINMUNOENSAYO SOBRE PROTEINAS TRANSFERIDAS A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA (INMUNOBLOT)

Las proteínas antigénicas transferidas a las membranas de nitrocelulosa, se hacen reaccionar con sus anticuerpos específicos. La unión antígeno-anticuerpo se evidencia con las anti-inmunoglobulinas adecuadas para cada antisuero que, marcadas enzimáticamente, actúan sobre un cromógeno dando lugar a un precipitado coloreado.

La nitrocelulosa se corta en tiras de 2-3 mm, que se colocan en una cubeta multicanal (Small Incubation Tray; BIO-RAD). Todo el proceso se desarrolla en agitación (Rotative Shaker Atom-86; ATOM. 100 r.p.m.).

La nitrocelulosa se bloquea con leche descremada (REGILAIT) al 5% en Tris salino (TS: Tris 20 mM, ClNa 0.13 M, pH 7.6) (Spinola & Cannon 1985; Coll, Muñoz, Queralt & Prats 1987), durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente la NC se incuba, con los antisueros humanos diluidos convenientemente en la solución de bloqueo, durante 18 horas a 4°C. Como dilución de trabajo se eligió la de 1/100, por ser aquella más concentrada que no presentaba uniones inespecíficas (Coll, Muñoz, Queralt, *et al.* 1989; Queralt, Madico, Mercader, *et al.* 1989). Seguidamente se lava tres veces con TS-gelatina (TS con gelatina al 0.75%) y se incuba 1 hora con un conjugado anti-Ig G humanas obtenido en conejo y marcado con peroxidasa (Anti-Human IgG (H+L)(rb)HRP Conj Lq; ICN BIOMEDICALS, cod 61-231-1), a la dilución 1/2.000 en TS-gelatina según indicación de la casa comercial.

Las reacción se evidencia por la precipitación enzimática de la diaminobencidina (DAB: 3,3'diaminobenzidina-tetrahydrochloride) en una solución al 0.05% (p/v) en Tris 0.1M pH 7.6 con un 0.01% de H₂O₂.

ANTISUEROS EMPLEADOS

Para la identificación de las proteínas inmunogénicas se emplearon antisueros de procedencia humana obtenidos de la seroteca del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona (HSCSP) (Queralt, Madico, Mercader, *et al.* 1989).

Las proteínas inmunoreactivas se evidenciaron con sueros seleccionados de pacientes afectos de hidatidosis y su especificidad se estudió con sueros de donantes sanos y afectos de otras parasitosis.

SUEROS DE PACIENTES AFECTOS DE HIDATIDOSIS

Se seleccionaron 19 sueros de pacientes con sospecha clínica de hidatidosis, confirmada serológicamente por inmunoelectroforesis (IEF) (ver: III.B.2.b.), hemaglutinación indirecta (HAI) (ver: III.B.2.a.).

SUEROS DE DONANTES SANOS

Como sueros control negativos, se escogieron 25 sueros de pacientes seronegativos, sin sospecha clínica de hidatidosis.

SUEROS DE PACIENTES CON OTRAS PARASITOSIS

Para la valoración de reacciones cruzadas con otros antígenos, se emplearon 33 sueros de pacientes en los que se había diagnosticado una parasitosis distinta a la hidatidosis (Tabla V).

Infecciones por nematodos
5 <i>Trichuris trichiura</i>
2 <i>Necator americanus</i>
1 <i>Ascaris lumbricoides</i>
1 <i>Strongylides stercoralis</i>
1 <i>Enterobius vermicularis</i>
1 <i>Trichinella spiralis</i>
2 filarias
Infecciones por trematodos
1 <i>Fasciola hepatica</i>
2 <i>Schistosoma</i> spp
Infecciones por protozoos
5 <i>Leishmania donovani</i>
5 <i>Toxoplasma gondii</i>
4 <i>Entamoeba histolytica</i>
3 <i>Plasmodium</i> spp

TABLA V. Sueros de pacientes afectados por otras parasitosis

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR

El peso molecular (PM) expresado en kilodaltons (kDa), se determina comparando la movilidad electroforética de las bandas proteicas respecto a la de unas proteínas estándar de PM conocido, que han sido sometidas simultáneamente a las mismas condiciones electroforéticas.

CALCULO DE LA MOVILIDAD RELATIVA

La movilidad relativa (Rf) es el cociente entre la distancia recorrida por la proteína problema, y la distancia máxima recorrida por la muestra.

La distancia máxima recorrida por la muestra, es la distancia existente entre el inicio del gel separador y el frente de migración electroforético, visualizado este último por el azul de bromofenol del tampón de muestra.

La medida de la distancia recorrida por una proteína precisa de su visualización por tinciones proteicas (ver : II.A.2.) o reacciones inmunoenzimáticas (ver : II.B.1.).

TINCION PROTEICA SOBRE NITROCELULOSA

Las proteínas transferidas a membranas de NC se tiñen por inmersión en una solución de negro amido al 0.5% (p/v) en metanol-agua-ácido acético glacial 4.5/4.5/1, seguida de una decoloración en el mismo solvente.

CALCULO DEL PESO MOLECULAR

Se extrapola el Rf de la proteína problema en una curva semilogarítmica que relaciona el Rf de las diferentes proteínas estándar con su PM.

Para el cálculo de las diferentes curvas de PM, se emplea una mezcla proteica estándar con bajo rango de PM (SDS-PAGE Standards, Low Range; BIO-RAD); que está compuesta por las siguientes proteínas : *rabbit muscle phosphorylase b* (97.4 kDa), *bovine serum albumin* (66.2 kDa), *hen egg white ovoalbumin* (42.7 kDa), *bovine carbonic anhydrase* (31.0 kDa), *soybean trypsin inhibitor* (21.5 kDa), *hen egg white lysozyme* (14.4 kDa).

ANTISUEROS

Para los estudios de caracterización e inmunolocalización de los antígenos mayoritarios de *E. granulosus* se emplearon antisuecos poli y monoespecíficos.

Los antisuecos humanos se emplean en la caracterización de las proteínas inmunogénicas (ver : II.B.2.).

Los antisuecos poli y monoespecíficos obtenidos por inmunización de animales de experimentación se emplean en la inmunolocalización antigénica.

ANTISUEROS HUMANOS

Se emplearon antisueros obtenidos de la seroteca del Servicio de Microbiología del HSCSP (ver : II.B.2.):

Sueros de pacientes afectos de hidatidosis : 19 sueros de pacientes con sospecha clínica de hidatidosis confirmada serologicamente.

Sueros de donantes sanos : 25 sueros de pacientes seronegativos.

Sueros de pacientes con otras parasitosis : 33 sueros de pacientes afectados de una parasitosis distinta a la hidatidosis.

OBTENCION DE ANTISUEROS POR INMUNIZACION EXPERIMENTAL EN CONEJOS

Los antisueros poliespecíficos dirigidos contra el líquido hidatídico y la totalidad de los antígenos parasitarios, así como los antisueros monoespecíficos dirigidos contra los dos antígenos mayoritarios de *E. granulosus* (Ag 5 y Ag B) se obtuvieron por inmunización experimental.

INMUNIZACION

ANTIGENOS EMPLEADOS Y PREPARACION DE INMUNOGENOS

Mezclas proteicas complejas.

LIQUIDO HIDATIDICO - Como fuente antigénica se emplea líquido hidatídico centrifugado (ver : I.B.1.), que es un complejo proteico de procedencia mixta (parásito y huésped) que contiene en forma nativa todos los antígenos parasitarios (mayoritariamente Ag 5 y Ag B), y algunas proteínas del hospedador (fundamentalmente inmunoglobulinas y albúmina).

ANTIGENOS PARASITARIOS MAYORITARIOS - Se obtienen por purificación del líquido hidatídico mediante métodos físico-químicos (ver : I.B.2.a.), separándose los antígenos parasitarios mayoritarios (Ag 5 y Ag B) de las proteínas del hospedador.

Para la posterior inoculación, se procedió a la preparación de ambos inmunogenos según la pauta que se detalla a continuación :

Se calcula la concentración proteica de ambas mezclas antigénicas y se diluyen convenientemente en suero fisiológico (SF: ClNa 0.85%) para conseguir una concentración final de 1 mg/ml.

Se procede a la emulsión de 1 ml de solución antigénica con 1 ml de adyuvante completo de Freund's (ACF: Freund's adjuvant, completo; SIGMA), añadiendo progresivamente, con jeringa, pequeñas alícuotas de la solución antigénica sobre el adyuvante hasta conseguir una emulsión homogénea.

Proteínas parasitarias purificadas por SDS-PAGE. La caracterización de las proteínas inmunogénicas de *E. granulosus* permitió identificar los antígenos parasitarios, obtenerlos de forma individualizada y emplearlos como inmunógenos en la obtención de antisueros, ya que la presencia de poliacrilamida o SDS no modifica la respuesta inmune (Boulard & Lecroisey 1982; Marshall, Pongparit & Kaufman 1987; Madico, Mercader, Pardo, *et al.* 1988).

Las proteínas antigénicas se separan por SDS-PAGE, en geles preparativos al 12%, siguiendo la metodología antes descrita (ver : I.B.2.b.).

En cada gel se siembra una única muestra de líquido hidatídico de una concentración de 1 mg de proteína total.

Las proteínas separadas se visualizan por tinción con CBB R-250 (H.A.2.a.) y se recortan del gel aquellas de PM coincidentes con el Ag 5 y el Ag B.

Las bandas proteicas recortadas se homogenizan en SF, para obtener un volumen final de 1 ml que se emulsiona en 1 ml de ACF.

ANTIGENO 5 - De entre las dos bandas proteicas con un PM de 65 kDa y 56 kDa reconocidas por múltiples autores como la forma no reducida del Ag 5 (Di Felice, Pini, Afferni & Vicari 1986; Shepherd & McManus 1987a; Shepherd & McManus 1987b; Shepherd & McManus 1988; Queralt, Madico, Mercader, *et al.* 1989; Coll, Muñoz, Queralt, *et al.* 1989), en la presente experiencia se emplea la banda proteica de 65 kDa obtenida de un gel de poliacrilamida al 12%.

ANTIGENO B - Al separar la mezcla antigénica en un gel de poliacrilamida al 12% , se escogió como Ag B la banda proteica de 16 kDa, por ser la que mejor se visualiza de entre las diferentes formas mono y poliméricas (8, 16, 24 y 32 kDa) reconocidas como Ag B (Shepherd & McManus 1987a; Shepherd & McManus 1987b; Shepherd & McManus 1988; Queralt, Madico, Mercader, *et al.* 1989; Coll, Muñoz, Queralt, *et al.* 1989; Lightowlers, Liu, Haralambous & Rickard 1989).

PAUTA DE INMUNIZACION

Antes de iniciar la pauta de inmunización se obtiene una muestra de sangre de los diferentes conejos, que corresponderá al día 0, y que debe de estar libre de anticuerpos frente a los antígenos de la experiencia.

La inmunización es semanal y por via intramuscular.

En cada inmunización se inoculan por animal 2 ml de los antígenos emulsionados en ACF, a razón de 0.5 ml por extremidad.

Antes de cada nueva inmunización se obtiene una muestra de sangre para control de la cinética de producción de anticuerpos.

Se rasura la oreja y desinfecta con alcohol de 70°.

Se estimula la vasodilatación arterial con xilol y masaje vigoroso de la zona.

Con una aguja intramuscular (0.8 x 25 mm; ICO) se canaliza la arteria central de la oreja cerca de su base, y se recogen entre 5-10 ml de sangre directamente en un tubo.

La inmunización se prolonga un mínimo de cuatro semanas y un máximo de ocho, en función de la cinética de producción de anticuerpos de cada animal frente a cada antígeno, sangrandolos cuando se alcanza la respuesta deseada.

CINETICA DE PRODUCCION DE ANTICUERPOS Y ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD

La cinética de producción de anticuerpos frente a los antígenos complejos se evaluó por hemaglutinación indirecta (Varela-Díaz, Guisantes, Ricardes, *et al.* 1975; Ambroise-Thomas & Desgeorges 1979), inmunoelectroforesis (Chordi & Kagan 1965; Kien, Molet & Ball 1980) e *immunoblot* como control de especificidad.

HEMAGLUTINACION INDIRECTA

Se valora la aglutinación de eritrocitos sensibilizados con líquido hidatídico, al enfrentarse con los sueros problema.

Para la experiencia se empleó un *kit* comercial (Agglutinotitre[®] Echino; ISMUNIT).

En placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo (NIRCO S.A.), se realizan diluciones dobles progresivas de los sueros problema en una solución absorbente que contiene compuestos solubilizados de membrana de hematies y proteínas ovinas. Se incuba 15 min a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Se añaden hematies de oveja sensibilizados con líquido hidatídico ovino, y se incuba dos horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.

La hemaglutinación se lee con ayuda de un espejo cóncavo (Titertek[®], plate reading mirror; FLOW), considerándose negativa cuando los hematies aparecen formando un botón compacto en el fondo del pocillo. Los resultados se expresan en títulos de positividad, y se consideran negativos cuando la aglutinación se produce a títulos inferiores del título considerado como diagnóstico (1/128).

INMUNOELECTROFORESIS

Las proteínas de la muestra antigénica son desplazadas electroforéticamente, posteriormente se coloca en un canal el antisuero y ambos se dejan difundir. La reacción antígeno-anticuerpo se evidencia en su punto de equivalencia por la formación de bandas de precipitación.

Como soporte se emplean placas de agarosa comerciales (Immunofilm - Cep Film - Micro-cuchterlony; SEBIA) con seis canales y siete pocillos.

Las placas de agarosa se rehidratan en agua destilada durante un mínimo de 8 horas, se sumergen durante una hora en tampón de electroforesis (tampón veronal 0.05M pH 8.2), se elimina el tampón sobrante y se montan sobre el soporte de la cubeta de electroforesis (ATOM AC-5) conectadas con el tampón a través de una tira de papel de filtro.

El antígeno (líquido hidatídico ovino concentrado 10x, en volumen equivalente a 0.1 mg de proteína total), se coloca en los pocillos con 1 µl de azul de Bromofenol, y se hace migrar mediante la aplicación de un voltaje constante de 150 V (alimentador: ATOM 502) durante 60-90 min.

Finalizada la electroforesis, se colocan las placas en cámara húmeda y se depositan en los canales 3 x 100 µl de los sueros problema y control (sueros humanos positivos), que se dejan difundir durante 48 horas.

Tras la difusión se sumergen las placas durante 30 min en una solución de citrato trisódico al 5%, se lavan durante 48 horas en varios baños de SF, y finalmente dos horas en agua destilada.

Las placas son deshidratadas entre papel de filtro y secadas en estufa a 37°C. Los arcos de precipitación son visualizados tras tinción con CBB R-250 al 0.5% en etanol-agua-ácido acético glacial 4.5/4.5/1 y posterior decoloración en etanol-agua-ácido acético glacial 3/6/1.

INMUNOBLOT

Las proteínas del líquido hidatídico son separadas por SDS-PAGE al 12% y transferidas a membranas de NC según la metodología previamente descrita (ver I.B.2.c.).

Sobre las proteínas transferidas se aplicarán técnicas de EIA (ver : II.B.1.c.), para valorar la cinética de producción de los anticuerpos frente a los antígenos purificados y la especificidad de los antisueros obtenidos.

Como dilución de trabajo de los antisueros se eligió la de 1/4000, pues en experiencias previas sobre la caracterización

inmunogénica del antígeno hidatídico (Muñoz, Coll, Queralt, *et al.* 1988), había demostrado ser aquella dilución más concentrada que no presentaba uniones inespecíficas.

OBTENCION DE LOS ANTISUEROS

Finalizada la pauta de inmunización, y obtenida la respuesta inmune deseada, los conejos son sangrados.

Los conejos se sangran por punción cardíaca con jeringa estéril de 50 ml (Jena-glass; ICO).

La sangre se recoge en tubos de centrifuga (100 x 13), se deja coagular durante dos horas a temperatura ambiente, y en reposo una noche a 4°C. Posteriormente se recupera el suero por decantación y se clarifica por centrifugación durante 10 minutos a 3.000 r.p.m. (KOKUSAN H-103N).

El suero es convenientemente alicuotado y se conserva congelado a -20°C hasta su uso.

PURIFICACION DE LOS ANTISUEROS

Todos aquellos antisueros dirigidos contra proteínas purificadas de *E. granulosus* que reaccionan con alguna otra proteína no parasitaria presente en el líquido hidatídico, se purifican mediante cromatografía de afinidad, previa separación de la fracción inmunoglobulinica.

SEPARACION DE LA FRACCION INMUNOGLOBULINICA

Las inmunoglobulinas de los conejos inmunizados con el Ag 5 son separadas del resto de componentes del suero, por tres precipitaciones consecutivas en sulfato de amonio [$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$] al 35% (Hebert, Pelham & Pittman 1973).

El suero se mezcla (v/v) con una solución de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 70% y se deja una hora a temperatura ambiente en agitación.

Tras la reacción, las inmunoglobulinas precipitadas se separan por centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 15 minutos (Eppendorf 5414S), y el sobrenadante se desecha. Seguidamente, las

inmunoglobulinas se resuspenden en agua destilada y se repite el proceso dos veces.

Finalizadas las tres precipitaciones, la eliminación del $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ se realiza por diálisis en PBS hasta que no se detectan trazas de sulfato (SO_4^{2-}) en el líquido de diálisis al añadir una solución saturada de cloruro cálcico (Cl_2Ba) (v/v).

CUANTIFICACION DE INMUNOGLOBULINAS

La concentración proteica de la fracción inmunoglobulínica purificada se cuantifica por espectrofotometría (Kirschenbaum 1973).

En espectrofotómetro (Uvikon 860; KONTRON) se lee la absorbancia de la solución de inmunoglobulinas una vez dializadas.

La lectura se efectúa a 280 nm en una célula de 1 cm de longitud (Quarzglass Suprasil 10mm; HELIMA), el valor de absorbancia obtenido se divide entre 1.35 y se hace equivalente a la concentración de inmunoglobulinas expresada en mg/ml.

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

Las inmunoglobulinas de los conejos inmunizados con el Ag 5, previamente separadas por precipitación, fueron purificadas por cromatografía de afinidad con el fin de eliminar aquellas dirigidas contra las proteínas del hospedador.

En la purificación se empleó una columna de sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno (CNBr), que había sido sensibilizada con suero ovino.

Preparación y sensibilización de la columna

Para la preparación de la columna (Econo-column low pressure, 2.5 x 10; BIO-RAD) se emplean 3.4 g de sefarosa CNBr en polvo (CNBr - activated Sepharose[®] 4B; PHARMACIA), que se regeneran y lavan con ClH 1mM en proporción 1/200 (p/v) (680 ml), obteniendo un volumen final de gel de 12 ml, que se equilibra con tampón de sensibilización (CO_2HNa 0.1M, ClNa 0.6M, pH 8.3) (5 ml por gramo de gel seco : 17 ml), y seguidamente se incuba con dos volúmenes de solución inmunoadsorbente (24 ml).



Como solución inmunoabsorbente se emplea suero ovino convenientemente diluido en tampón de sensibilización (2.5 ml de suero en 21.5 de tampón), con el fin de enfrentar 10 mg de proteína por cada ml de gel (120 mg). La incubación con el inmunoabsorbente se realiza en rotación, dos horas a temperatura ambiente seguidas de 18 horas a 4°C.

Se calcula el rendimiento de unión del inmunoabsorbente y se bloquean los grupos activos libres con 2 volúmenes de etanolamina 2M pH 8.0 (24 ml), durante tres horas en rotación a temperatura ambiente.

Posteriormente se elimina el exceso de inmunoabsorbente con cuatro lavados alternativos en 10 volúmenes de tampón acetato 0.1M, ClNa 0.5M, pH 4 (120 ml) y 10 de tampón de sensibilización respectivamente.

Finalmente se equilibra la columna con 10 volúmenes de tampón PBS-salino (PBS, ClNa 0.5M, pH 7.2) (120 ml).

Cromatografía de afinidad

La solución de inmunoglobulinas del antisuero a purificar se enfrentan con el inmunoabsorbente en una proporción de 9 mg de proteína por 5 ml de gel sensibilizado (21.6 mg), diluyéndose al 1/2 en tampón PBS-salino. La incubación se realiza en tubos de fondo cónico de 50 ml (PACISA), durante 48 horas a 4°C en rotación.

Finalizada la incubación, las inmunoglobulinas específicas permanecen libres en la solución.

La mayor parte de las inmunoglobulinas purificadas se recuperan del sobrenadante, tras una centrifugación de 5 min a 500 r.p.m. (KOKUSAN H-103N), y seguidamente se someten a una segunda centrifugación de 5 min a 12.000 r.p.m. (Eppendorf 5414S) para eliminar el gel arrastrado. Tras montar la columna, el resto de inmunoglobulinas se recoge por lavados sucesivos del gel con tampón PBS-salino hasta que no se detecta arrastre de proteína.

Regeneración y conservación de la columna

Para la regeneración de la columna se eliminan las inmunoglobulinas adsorbidas dirigidas contra proteínas del hospedador por elución con tampón glicina 0.2M, ClNa 0.5M, pH 2.5.

Tras lavado con PBS-salino, la columna se conserva a 4°C con PBS, Tween 20 al 0.05% y azida sódica 100 mM.

DESARROLLO DE PROTOSCOLEX CULTIVADOS *IN VITRO* Y PRODUCCION DE ANTIGENOS DE SECRECCION-EXCRECION

El mantenimiento del cultivo *in vitro* de protoscólex se realiza para estudiar el desarrollo del parásito en la dirección quística y la producción de antígenos de secreción-excreción.

DESARROLLO IN VITRO DE *E. granulosus*

El estudio del proceso de diferenciación quística de los protoscólex de *E. granulosus*, en sus diferentes fases de crecimiento, se realizó por observación microscópica diaria de dichos protoscólex cultivados *in vitro* en un medio monofásico líquido (ver : I.C.2.).

El estado de los protoscólex se observa mediante un microscopio invertido (Olympus Inverted Research Microscope - model IMT; OLYMPUS), al que se ha acoplado una cámara fotográfica automática (Orthomat; LEITZ).

ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE ANTIGENOS DE SECRECCION-EXCRECION

La liberación al medio de cultivo de los antígenos parasitarios de secreción-excreción, permite la recuperación de estos a partir del sobrenadante y su ulterior estudio.

OBTENCION DE LOS SOBRENADANTES

El sobrenadante del medio de cultivo se recupera y conserva congelado a -20°C de forma individualizada, anotando el día de recogida y el estado de desarrollo de los protoscolex.

El sobrenadante se recoge, en condiciones estériles, por aspiración con pipeta Pasteur, eliminándose los elementos formes arrastrados, por centrifugación a 1.000-1.500 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C (KOKUSAN H-103N).

PREPARACION DE LOS SOBRENADANTES

La escasa concentración proteica de las diferentes alícuotas de sobrenadantes, indetectable por los métodos habituales (Bradford), obligó a la agrupación de estas y a su posterior concentración.

Los sobrenadantes se agrupan en función del estado de desarrollo de los protoscolex, como se detalla a continuación :

- Grupo A primeros 7 días de cultivo
- Grupo B período de máxima vitalidad, que abarca las semanas 2, 3, 4, 5 y 6.
- Grupo C período de lisis, comprende los sobrenadantes recogidos entre la semana 7 y la 9.

CONCENTRACION POR ULTRAFILTRACION

Los sobrenadantes se concentran unas cincuenta veces por ultrafiltración con filtros cuyo límite de peso molecular es de 10.000 daltons (Immersible CX-10, Pellicon Type PTGC, nmwl: 10.000; MILLIPORE CORPORATION).

Los filtros se sumergen en el medio de cultivo y conectan a través de un matraz con una bomba de vacío (Bomba de vacío/ presión XX 56 220 V/ 50 Hz; MILLIPORE CORPORATION).

Las macromoléculas retenidas (PM >10.000 Da) quedan en el recipiente de la muestra original, y el ultrafiltrado, tras superar el filtro, se recoge en el matraz que conecta con la bomba de vacío.

CONCENTRACION POR PRECIPITACION

Las proteínas presentes en los sobrenadantes son concentradas por precipitación con ácido tricloroacético (Auer, Hermentin & Aspöck 1988).

El sobrenadante se mezcla (v/v) con una solución de ácido tricloroacético al 40%, y se deja reaccionar en baño de hielo durante 30 min.

El precipitado se separa por centrifugación a 12.000 r.p.m. (Eppendorf 5414S) durante una hora a 4°C, se lava dos veces con etanol frío, y se deseca bajo vapores de N₂.

ANALISIS ELECTROFORETICO E INMUNOLOGICO DEL SOBRENADANTE

Los sobrenadantes concentrados son separados electroforéticamente por SDS-PAGE, y teñidos con CBB R-250 o transferidos a membranas de nitrocelulosa (NC) y revelados con antisucros específicos.

El análisis se completa con un *dot blot*, con el fin de incrementar al máximo la sensibilidad de la detección inmunológica de los antígenos.

SDS-PAGE

Los compuestos proteicos de los diferentes grupos de sobrenadantes (grupo A, B, C y medio sin sembrar como control) se separan por SDS-PAGE al 5-20% según la metodología previamente descrita (ver : I.B.2.b.), posteriormente se tiñen con CBB R-250 (ver : II.A.2.a.) y se calcula el PM de las bandas visualizadas (ver : II.C.), con el fin evidenciar las bandas proteicas antigénicas de PM conocido.

La separación se realiza en geles analíticos al 12%, con capacidad para diez muestras.

De cada muestra se siembran 20 μ l del sobrenadante concentrado, en el que no se pudo calcular la concentración proteica por no tener volumen suficiente.

INMUNOBLOT

Tras la separación electroforética, las diferentes muestras fueron transferidas por electroelución a membranas de nitrocelulosa (ver : I.B.2.c.), y se busco la presencia de los antígenos parasitarios (Ag 5 y Ag B) por técnicas de enzimoinmunoensayo (ver:II.B.1.c.).

La separación electroforética se realiza en geles preparativos del 12%, con capacidad para diez muestras.

De cada muestra se siembran 50 μ l del sobrenadante concentrado.

Tras la transferencia se recortan dos tiras de NC de cada muestra. El recorrido de cada muestra se evidencia por la visualización de una banda superior de pironina y otra inferior. La pironina, en solución, debe haberse añadido previamente en el gel durante la migración de la muestra, una vez ha entrado la muestra en el gel separador y poco antes de finalizar la electroforesis.

Para la detección de las proteínas antigénicas se emplean los antisueros monoespecíficos previamente obtenidos frente al Ag 5 y al Ag B (ver : III.B.1.a.(2)).

DOT BLOT

Las proteínas presentes en los sobrenadantes son inmovilizadas sobre membranas de NC. La presencia de los antígenos parasitarios se evidencia por técnicas de enzimoimmunoensayo, aplicándose los mismos principios metodológicos que en el *immunoblot* (Hawkes, Niday & Gordon 1982; Zheng, Zhao & Feng 1986).

Las muestras de los diferentes sobrenadantes (grupos A, B, C y control) se depositan en varias aplicaciones sobre la NC, sembrándose varias veces sobre la misma zona hasta un volumen total de 40 μ l, y se revelan con técnicas de EIA procesándose de igual modo al descrito previamente para las membranas transferidas por *electroblotting* (ver : II.B.1.c.).

La detección de las proteínas antigénicas se realiza empleando los antisueros monoespecíficos previamente obtenidos frente al Ag 5 y al Ag B (ver : III.B.1.a.(2)).