

## INMUNODIAGNÓSTICO DE HIDATIDOSIS: EVALUACIÓN DE ANTÍGENOS DE LÍQUIDO HIDATÍDICO Y DE LÍQUIDO VESICULAR DE CISTICERCO DE *Taenia crassiceps*

Emilio COLTORTI (1) & Graciela CAMMARIERI (2)

### RESUMEN

Se comparó la especificidad y sensibilidad del ensayo inmunoenzimático (EIE) actualmente en uso en las áreas de Sudamérica donde la hidatidosis causada por *Echinococcus granulosus* es endémica, con dos versiones de EIE, una de las cuales emplea un antígeno hidatídico de diferente preparación y la otra líquido vesicular de cisticerco de *Taenia crassiceps* (LVCC). Se estudió también para ambos antígenos el efecto de la neutralización previa de los anticuerpos anticomponentes séricos ovinos o murinos, y antifosforilcolina sobre la eficiencia diagnóstica de los EIE.

Se analizó la frecuencia de distribución de los títulos obtenidos en los tres sistemas de EIE frente a sueros normales, hidatídicos a la prueba de doble difusión arco 5 (DD5) e hidatídicos DD5 negativos. Los resultados mostraron una significativa disminución de sensibilidad del LVCC frente a los antígenos hidatídicos lo cual hace inconveniente su uso para inmunodiagnóstico de hidatidosis.

No se observaron diferencias significativas entre los dos antígenos hidatídicos. El análisis por SDS-PAGE mostró una marcada diferencia de composición entre el LVCC y los antígenos hidatídicos, y algunas diferencias entre estos últimos posiblemente debidas a los procesos de preparación.

**UNITERMOS:** Hidatidosis; *Echinococcus granulosus*; *Taenia crassiceps*; Inmunodiagnóstico.

### INTRODUCCIÓN

La doble difusión arco 5 (DD5) es la prueba inmunodiagnóstica más difundida y empleada en los hospitales de las áreas de Sudamérica donde la hidatidosis causada por *Echinococcus granulosus* es endémica<sup>3,7</sup>. La difusión que en los últimos años han tenido los métodos inmunoenzimáticos ha llevado a que en la actualidad la mayoría de los hospitales de mayor complejidad cuenten con equipamiento, insumos y personal entrenado para su ejecución. Esto ha hecho posible la implementación de un ensayo inmunoenzimático (EIE) para diagnóstico de hidatidosis humana<sup>4,5</sup>.

El uso conjunto de la prueba de doble difusión arco 5 (DD5) y el EIE ha permitido aumentar la sensibilidad del inmunodiagnóstico en pacientes sintomáticos con diagnóstico presuntivo<sup>6</sup>.

En el EIE actualmente en uso los sueros son

previamente neutralizados con suero normal ovino y fosforilcolina<sup>6,10</sup> y se emplea el mismo antígeno que en la DD5 con la correspondiente adecuación de concentración<sup>7</sup>. Dados que originalmente este antígeno fue desarrollado para pruebas de doble difusión en gel, su proceso de elaboración fue diseñado para obtener un producto final de alta concentración proteica acorde con las necesidades de estas pruebas. Este proceso consiste en una diálisis exhaustiva frente a agua, concentración por liofilización y control mediante inmunoelectroforesis<sup>2</sup>.

Dado que los antígenos que se emplean en EIE no requieren una elevada concentración, se diseñó un proceso de elaboración basado en concentración por ultrafiltración, el cual preserva mejor las características físico-químicas originales de los componentes, mejora el rendimiento y disminuye el tiempo de proceso.

(1) Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis, Programa de Salud Pública Veterinaria, OPS/OMS, Casilla 3092, Correo Central, 1000 - Buenos Aires, Argentina.

(2) Hospital Central, Secretaría de Salud Pública, Municipalidad de San Isidro, 1642 - San Isidro, Buenos Aires, Argentina.

El estudio por inmunoelectrotransferencia de la reactividad de los sueros de pacientes hidatídicos ha demostrado algunas similitudes antigénicas entre el líquido hidatídico y el líquido vesicular del cisticerco *Taenia crassiceps* (LVCC). Este hecho y la facilidad de producir cisticercos de *T. crassiceps* por infección experimental de ratones en el laboratorio han llevado a sugerir que el LVCC podría ser una fuente alternativa de antígeno para inmudiagnóstico de hidatidosis<sup>8</sup>.

El presente trabajo compara la eficiencia diagnóstica del EIE actualmente en uso, que emplea el antígeno hidatídico dializado (AHD), con dos tipos de EIE, uno de los cuales emplea un antígeno hidatídico concentrado por ultrafiltración (AHUF) y el otro, líquido vesicular de cisticerco de *T. crassiceps* (LVCC). En ambos casos se estudió también el efecto de la neutralización previa de los anticuerpos anticomponentes séricos ovinos o murinos y antifosforilcolina sobre la eficiencia diagnóstica de los EIE.

## MATERIALES Y METODOS

### Antígenos hidatídicos:

Todos los antígenos hidatídicos se prepararon con líquido hidatídico obtenido de quistes desarrollados naturalmente en ovinos (LHO). El antígeno que se empleó en la prueba de doble difusión arco 5 (DD5) se preparó como se describiera anteriormente<sup>2</sup>, el LHO se dializó exhaustivamente contra 100 veces su volumen de agua destilada, se liofilizó y se controló por inmunoelectroforesis.

Para sensibilizar las microplacas de EIE se emplearon dos antígenos hidatídicos. Uno de ellos se preparó a partir del antígeno de DD5 (AHDD5). Para ello el AHDD5 liofilizado se disolvió en buffer carbonato 0,1 M pH 9,6 a una concentración de 500 µg peso seco/ml, se centrifugó a 55.000 g durante 30 minutos a 5°C, se identificó como antígeno hidatídico dializado (AHD) y se conservó a 35°C.

El otro antígeno hidatídico usado en EIE se identificó como antígeno hidatídico ultrafiltrado (AHUF). Para prepararlo el LHO se centrifugó a 55.000 g durante 30 minutos a 5°C y el sobrenadante se concentró por ultrafiltración a través de una membrana permeable a moléculas de peso inferior a 5.000 daltons (Diaflo, YM 5.000,

Amicon Co., MA., U.S.A.) hasta una concentración de 10 mg/ml de proteína medida por el método de BRADFORD<sup>1</sup>.

El AHUF se conservó a -35°C. Durante el proceso de preparación del AHUF, se usó como inhibidor de proteasa, fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF, Sigma, Chemical Co., St. Louis, U.S.A.) a una concentración final 5 mM.

### Antígeno de cisticerco de *T. crassiceps*

Los cisticercos de *T. crassiceps* se obtuvieron de ratones infectados experimentalmente. Ratones Balb/c de 45 días de edad, se infectaron con 10 cisticercos cada uno por vía intraperitoneal, 80 días después se sacrificaron y se recogieron los cisticercos desarrollados en la cavidad abdominal. Los cisticercos se lavaron exhaustivamente en PBS, se secaron sobre papel de filtro y se centrifugaron a 55.000g durante 30 minutos a 5°C para romperlos y separar el líquido vesicular de las membranas y escolex. El sobrenadante se identificó como líquido vesicular de cisticerco de *T. crassiceps* (LVCC). La concentración de proteína de diferentes lotes de LVCC osciló entre 3,0 y 3,5 mg/ml. El LVCC se conservó a -35°C.

### Sueros humanos:

Se estudiaron 397 sueros de personas adultas de ambos sexos sin antecedentes de hidatidosis que concurren al examen de salud para gestionar su libreta sanitaria y 151 sueros preoperatorios de pacientes con hidatidosis confirmada de los cuales 120 habían sido positivos a la prueba de doble difusión arco 5 (DD5) y 31 habían sido negativos.

Todos los sueros se estudiaron en series de diluciones dobles desde 1:25 hasta 1:51.200. Se empleó como diluyente una solución salina tamponada con fosfatos (NaCl 0,15 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01 M) pH 7,2 con 0,5% de Tween 20 (SSF/T 0,5). Con la finalidad de evidenciar posibles reacciones inespecíficas con los antígenos AHUF y LVCC, usados en el EIE los sueros también se estudiaron previa neutralización de los anticuerpos anti-componentes séricos ovinos o murinos y anti-fosforilcolina. La neutralización se realizó empleando como diluyente una solución salina tamponada con Tris (NaCl 0,15 M; tris 0,01M) pH 7,2 con 0,5% de Tween 20, 1% de suero normal ovino o murino y 10 mM de fosforilcolina.

### Ensayo Inmunoenzimático (EIE):

Se diseñaron 4 sistemas a fin de evaluar los dos antígenos en estudio (AHUF y LVCC) y la conveniencia o no de neutralizar los sueros previamente. Estos sistemas se compararon con el que se usa actualmente el cuál emplea AHD con sueros neutralizados (EIE-AHD/N) y cuya optimización se describió anteriormente<sup>7</sup>. Las condiciones de trabajo para los antígenos AHUF y LVCC que se detallan a continuación se optimizaron mediante curvas dosis-respuesta.

Las microplacas de 96 pocillos de fondo plano se sensibilizaron colocando en cada pocillo 50 µl de antígeno diluído en buffer carbonato 0,1 M; pH 9,6 durante 18 horas a 4°C en cámara húmeda. El AHD y el AHUF se usaron a 20 µg/ml, ambos en placas Immulon I, mientras que el LVCC se usó a 20 µg/ml en placas Immulon II (Dynatech Lab Inc., Virginia, U.S.A.).

El exceso de antígeno se eliminó invirtiendo las placas y haciendo 3 lavados sucesivos de 4 minutos cada uno con 200 µl de solución salina tamponada con fosfatos (NaCl 0,15 M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 M) pH 7,2 con 0,5% de Tween 20 (SSF/T 0,5). A continuación de los lavados se colocó en las placas 50 µl/pocillo de la dilución correspondiente de los sueros en estudio y del suero control. Los pocillos correspondientes al blanco de reactivos se cargaron con 50 µl de SSF/T 0,5. Las placas se incubaron en cámara húmeda 37°C durante 30 minutos. Se eliminó el contenido y se lavaron con SSF/T 0,5 como se indicara anteriormente. A continuación se cargaron los pocillos con 50 µl de conjugado (suero anti-IgG, IgA, IgM humanas (H+L) conjugado con peroxidasa, Dako Co., CA, U.S.A.) diluído con SSF/T 0,5 a la concentración elegida. La dilución de trabajo del conjugado se seleccionó en base a curvas dosis-respuesta y fueron del orden de 1/800 a 1/1200 según el sistema.

En el caso del sistema que usa AHUF el conjugado se neutralizó previamente agregando al diluyente 0,5% de suero normal ovino para eliminar el fondo observado en los blancos debido a la reacción del conjugado con componentes séricos ovinos contenidos en el antígeno.

Las placas se incubaron nuevamente en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos, se eliminó luego el contenido y se lavaron como se indicó anteriormente. Se distribuyó luego en cada pocillo

100 µl de reactivo sustrato-indicador (12 ml de ácido cítrico 0,05 M; pH 3,5 + 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5M + 50 µl ABTS 40 mM) (ABTS: 2,2' azino-di(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid), Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.) previamente termostatzado a 37°C y se incubó en cámara húmeda a 37°C durante exactamente 5 minutos, se homogeneizó por agitación y se continuó incubando otros 5 minutos. Concluído el tiempo, la reacción se detuvo agregando 100 µl de ácido fluorhídrico 0,1 M pH 3,3 a cada pocillo. Las placas se leyeron a 410 nm en un fotocolorímetro vertical para lectura de microplacas (MR-600 Dynatech Lab. Inc., Virginia, U.S.A.), el cual descuenta automáticamente el valor del banco de reactivos en cada una de las mediciones. El título de los sueros en estudio se definió como la inversa de la mayor dilución que presentó una lectura de densidad óptica (DO) igual o mayor a 0,15. La reproducibilidad de la prueba se monitoreó mediante un suero control de título conocido. Dado que los valores de DO para un mismo suero pueden presentar diferencias de placa a placa (dentro del día) y día a día, cuando fue necesario se corrigieron para hacerlos comparables entre sí. Para ello se usó el suero control el cual se preparó para que presentara en la dilución 1:400, un valor de DO de 0,25. Este valor de DO para esa dilución del suero control se consideró constante y permitió hacer las correcciones de la DO de los sueros en estudio cuando fue necesario. Las correcciones se hicieron con la siguiente ecuación: DO corregida del suero en estudio = DO obtenida para el suero en estudio a corregir x DO constante del suero control DO obtenida para el suero control.

### Doble difusión arco 5 (DD5):

La prueba se realizó e interpretó como se describiera anteriormente<sup>2,3</sup>.

### Electroforesis en gel de poliacrilamida con docecil sulfato de sodio (SDS-PAGE):

El análisis cualitativo de los tres antígenos (AHD, AHUF y LVCC) se hizo por SDS-PAGE y se reveló con coloración de plata.

Las muestras conteniendo entre 3 y 10 µg/µl de proteína se trataron 100°C durante 2 minutos en buffer tris/HCl 0,05 M pH 8,0 con 2,0% de SDS, 5% de 2-mercaptoetanol, 20% de glicerina y 0,1% de azul de bromofenol (ABF). Como marcadores de peso molecular se usaron los estándares de alto

y bajo peso molecular (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., N. Jersey, U.S.A.) según las instrucciones del fabricante.

El SDS-PAGE se realizó de acuerdo al procedimiento de LAEMMLI con modificaciones<sup>12</sup>. Se usaron geles de 1mm de espesor y 20 cm de largo con un gel de concentración de 3,0% y un gel de separación en gradiente de 3,3 a 20%. La electroforesis se realizó a 40mA/300v durante aproximadamente 4 a 5 horas, la corrida se detuvo cuando el frente de ABF salió del gel. Los geles se tiñeron con coloración de plata siguiendo el procedimiento de TSANG et al.<sup>11</sup>

## RESULTADOS

Al igual que se demostrara anteriormente para el EIE con antígeno AHD (EIE-AHD/N)<sup>7</sup>, los títulos en el EIE empleando el AHUF (EIE-AHUF) presentaron diferencias cuando los sueros se usaron sin neutralizar y neutralizados con sueros normal ovino y fosforilcolina. Los resultados que se presentan corresponden a los valores obtenidos con los sueros neutralizados (EIE-AHUF/N). No se observaron diferencias entre los sueros no neutralizados y neutralizados con suero normal murino y fosforilcolina en el EIE con antígeno LVCC; los resultados que se presentan corresponden a los valores obtenidos con los sueros sin neutralizar (EIE-LVCC).

La frecuencia de la distribución de los títulos obtenidos en los tres sistemas de EIE: EIE-AHD/N, EIE-AHUF/N y EIE-LVCC; al estudiar los 397 sueros no hidatídicos, los 120 sueros hidatídicos positivos a la DD5 y los 31 sueros hidatídicos negativos a la DD5 se presenta en la tabla 1.

En la tabla 2 se presentan los valores de especificidad y sensibilidad calculados para los posibles títulos de corte de los tres EIE estudiados en base a los resultados obtenidos con los 397 sueros no hidatídicos y los 151 sueros hidatídicos.

Los valores de sensibilidad calculados separadamente para los 120 sueros hidatídicos positivos a la DD5 y los 31 sueros hidatídicos negativos a la DD5 se presentan en la tabla 3.

Se analizaron estadísticamente por el método del Chi cuadrado ( $P < 0,05$ ) las diferencias de sensibilidad observadas entre el método actualmente en uso, EIE-AHD/N y las dos alternativas estudiadas,

EIE-AHUF/N y EIE-LVCC. El análisis se realizó tomando como título diagnóstico de cada prueba a aquel que le adjudicara una especificidad entre el 99,0-99,9%, EIE-AHD/N; 1:400, EIE-AHUF/N, 1:50 y EIE-LVCC, 1:800. Se estudiaron separadamente los resultados obtenidos con el grupo de sueros hidatídicos positivos a la DD5, el grupo de sueros hidatídicos negativos a la DD5 y el conjunto de todos los sueros hidatídicos. Las diferencias de sensibilidad entre el EIE-AHD/N y el EIE-AHUF/N no son significativas para ninguno de los tres grupos de sueros hidatídicos, en cambio, si son significativas para los 3 grupos cuando se compara el EIE-AHD/N con el EIE-LVCC.

El análisis cualitativo por SDS-PAGE de los tres antígenos estudiados, AHD, AHUF y LVCC se presenta en la Fig.1.

## DISCUSION

A fin de comparar la eficiencia diagnóstica de los tres procedimientos estudiados es necesario definir el título diagnóstico de cada uno de ellos en base a un criterio común. Si adoptamos como condición que ninguna de las pruebas tenga una especificidad menor al 99,0%, los títulos diagnósticos serán: EIE-AHD/N, 1:400; EIE-AHUF/N, 1:50 y EIE-LVCC, 1:800. Analizando los resultados de las Tablas 1 y 2 en base a esos títulos diagnósticos se observa que frente a la totalidad de sueros hidatídicos el AHD/N tiene una sensibilidad de 0,927, el AHUF/N de 0,894 y el LVCC de 0,815.

Cuando los sueros hidatídicos se diferencian en positivos y negativos a la DD5 (Tabla 3); la sensibilidad del AHD/N para el grupo de sueros hidatídicos positivos a la DD5 es 1,000, la del AHUF/N es 1,000 y la del LVCC es 0,950. Respecto al grupo de sueros hidatídicos negativos a la DD5 la sensibilidad del AHD/N es de 0,645, la del AHUF/N es de 0,484 y la del LVCC es 0,290 (Tabla 3).

Se considera que, para adoptarse como prueba diagnóstica a nivel de laboratorios hospitalarios además de las condiciones de especificidad fijadas anteriormente, el EIE debe identificar como hidatídicos a todos los pacientes DD5 positivos y a algunos de los pacientes DD5 negativos<sup>7</sup>. Cumplen esta condición el EIE-AHD/N y el EIE-AHUF/N. El EIE-LVCC no cumplen esta condición, ya que para una especificidad no menor del 99,0% sólo califica como hidatídicos al 95% de los pacientes hidatídicos DD5

positivos y es el procedimiento que detecta menos pacientes hidatídicos DD5 negativos (Tabla 3). Esta significativa disminución de sensibilidad del LVCC frente al antígeno hidatídico homólogo, hace inconveniente su uso para inmunodiagnóstico de hidatidosis. El análisis por SDS-PAGE muestra una marcada diferencia de composición entre el LVCC y los antígenos hidatídicos. Sin embargo, dada la posibilidad de producirlo por infección experimental en ratones, el LVCC podría ser una fuente alternativa de material parasitario para la purificación de moléculas con determinantes antigénicos comunes con el líquido hidatídico que hayan mostrado buenas condiciones para uso diagnóstico<sup>10</sup>.

El análisis por SDS-PAGE del AHD y el AHUF (Fig. 1) muestra diferencias en la zona de altos pesos moleculares, en la zona de 28 a 40 Kd y en la inferior a 18 Kd. El AHD presenta un fondo a lo largo de casi toda la corrida debido posiblemente a procesos de proteólisis durante la preparación. Es probable que la prolongada dialisis frente a agua durante la preparación del AHD facilite la actividad proteolítica, produzca la desnaturalización a veces

irreversible de algunos componentes y modifique en algunos casos sus propiedades físico-químicas. La consecuente modificación de las proporciones relativas de los componentes específicos y no específicos contenidos en el líquido hidatídico podría ser la causa de la diferente reactividad del grupo de sueros no hidatídicos reflejada en los títulos diagnósticos y de las diferencias observadas en el grupo de pacientes hidatídicos DD5 negativos en las condiciones de especificidad fijadas. A pesar de esas diferencias, ambos antígenos, el AHD y el AHUF pueden ser considerados adecuados para inmunodiagnóstico de hidatidosis mediante EIE y la adopción y uso de uno de ellos dependerá de las facilidades de los laboratorios productores.

Los valores de sensibilidad obtenidos frente al grupo de sueros hidatídicos estudiados solo son válidos a los fines de comparar las diferentes pruebas. No debe asumirse que esos valores son una medida de la sensibilidad diagnóstica de estas pruebas dado que una considerable proporción de portadores de quistes hidatídicos no presentan anticuerpos detectables anti-antígenos hidatídicos<sup>4</sup>.

Tabla 1

Distribución de los títulos obtenidos en EIE con los tres tipos de antígeno evaluados al estudiar 397 sueros no hidatídicos, 120 sueros hidatídicos positivos a la DD5 y 31 sueros hidatídicos negativos a la DD5.

TITULOS	TIPO DE EIE								
	EIE-AHD/N Sueros			EIE-AHUF/N Sueros			EIE-LVCC Sueros		
	No H	H-DD5+	H-DD5-	No H	H-DD5+	H-DD5-	No H	H-DD5+	H-DD5-
>51200		13(10,8)						4( 3,3)	
51200		11( 9,2)			2( 1,7)			4( 3,3)	
25600		21(17,5)			4( 3,3)			14(11,6)	
12800		17(14,2)			7( 5,8)			22(18,3)	
6400		15(12,5)			11( 9,2)			15(12,5)	
3200		22(18,3)	2( 6,4)		17(14,2)			22(18,3)	
1600		15(12,5)	8(25,8)		11( 9,2)			11( 9,2)	2( 6,4)
800		4( 3,3)	8(25,8)		19(15,8)	1( 3,2)	3(0,8)	22(18,3)	7(22,6)
400	4( 1,0)	2(1,7)	2( 6,4)		23(19,2)	1( 3,2)	4(1,0)	6( 5,0)	8(25,8)
200	28( 7,0)		3( 9,7)		12(10,0)	2( 6,4)	23(5,8)		1( 3,2)
100	72(18,1)		3( 9,7)		11( 9,2)	4(12,9)	66(16,6)		6(19,4)
50	117(29,5)		2( 6,4)	2( 0,5)	3( 2,5)	7(22,6)	108(27,2)		4(12,9)
25	123(31,0)		2( 6,4)	11( 2,8)		3( 9,7)	140(35,3)		1( 3,2)
< 25	53(13,4)		1( 3,2)	384(96,7)		13(41,9)	53(13,4)		2( 6,4)
TOTAL	397	120	31	397	120	31	397	120	31

EIE-AHD/N: líquido hidatídico dializado, neutralización previa de los anticuerpos anti-SNO y anti-FC.

EIE-AHUF/N: líquido hidatídico ultrafiltrado, neutralización previa de los anticuerpos anti-SNO y anti-FC.

EIE-LVCC: líquido vesicular de *Cisticercos* de *T. crassiceps*.

No H: sueros no hidatídicos; H-DD5+: sueros hidatídicos positivos a la DD5; H-DD5-: sueros hidatídicos negativos a la DD5.

Tabla 2

Valores de especificidad y sensibilidad calculados para los posibles títulos de corte de los tres tipos de EIE estudiados para diagnóstico de hidatidosis, sobre 397 sueros no hidatídicos y 151 sueros hidatídicos (120 sueros DD5 positivos y 31 sueros DD5 negativos).

LIMITE DE REACTIVIDAD (TITULO)	ENSAYO INMUNOENZIMATICO (EIE)					
	AHD/N		AHUF/N		LVCC	
	Esp.	Sen.	Esp.	Sen.	Esp.	Sen.
1600					1,000	0,622
800	1,000	0,901			0,992	0,815
400	0,990	0,927			0,982	0,907
200						
100			1,000	0,828		
50			0,995	0,894		

AHD/N: Líquido hidatídico dializado, neutralización previa de los anticuerpos anti-SNO y anti-FC.

AHUF/N: Líquido hidatídico ultrafiltrado, neutralización previa de los anticuerpos anti-SNO y anti-FC.

LVCC: Líquido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps*.

Tabla 3

Valores de sensibilidad calculados para los posibles títulos de corte de los 3 tipos de EIE estudiados para diagnóstico de hidatidosis frente a los 120 sueros hidatídicos positivos a la DD5 y los 31 sueros hidatídicos negativos a la DD5.

LIMITE DE REACTIVIDAD (TITULO)	ENSAYO INMUNOENZIMATICO (EIE)					
	AHD/N		AHUF/N		LVCC	
	H-DD5+	H-DD5-	H-DD5+	H-DD5-	H-DD5+	H-DD5-
1600					0,777	0,064
800	0,983	0,581			0,950	0,290
400	1,000	0,645			0,100	0,548
200						
100			0,975	0,258		
50			0,100	0,484		

AHD/N: Líquido hidatídico dializado, neutralización previa de los anticuerpos anti-SNO y anti-FC.

AHUF/N: Líquido hidatídico ultrafiltrado, neutralización previa de los anticuerpos anti-SNO y anti-FC.

LVCC: Líquido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps*

H-DD5+: Sueros hidatídicos positivos a la DD5.

H-DD5-: Sueros hidatídicos negativos a la DD5.

## SUMMARY

**Immunodiagnosis of hydatid disease: evaluation of antigens from hydatid cyst fluid and the vesicular fluid of *Taenia crassiceps* metacestode.**

The specificity and sensitivity of the enzyme immunoassay (EIA), presently used in South America areas where hydatidosis caused by *Echi-*

*nococcus granulosus* is endemic, was compared to two alternative EIA. One of these uses an hydatid antigen of different preparation and the other vesicular fluid of *Taenia crassiceps* cisticerci (VFCC). The effect of previous neutralization in the serum sample of antibodies anti-normal ovine or murine sera and anti-phosphorylcholine on the diagnostic efficiency of these EIA was studied.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sr. Roberto García por su esmerada colaboración técnica y al Dr. Carlos Larralde (Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México), por habernos cedido gentilmente la cepa de *T. crassiceps*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BRADFORD, M.M. - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72: 248-254, 1976.
2. CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, OPS/OMS - Diagnóstico inmunológico de la hidatidosis humana mediante la prueba de doble difusión arco 5. Ramos Mejía, Buenos Aires, Centro Panamericano de Zoonosis, 1979. (Nota Técnica N° 22).
3. COLTORTI, E.A. & VARELA-DIAZ, V.M. - Detection of antibodies against *Echinococcus granulosus* arc 5 antigens by double diffusion test. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 72: 226-229, 1978.
4. COLTORTI, E.A.; FERNANDEZ, E.; GUARNERA, E.; LAGO, J. & IRIARTE, J. - Field evaluation of an enzyme immunoassay for detection of asymptomatic patients in an hydatid control program. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 38: 603-607, 1988.
5. COLTORTI, E.A.; GUARNERA, E.; LARRIEU, E.; SANTILLAN, G. & AQUINO, A. - Seroepidemiology of human hydatidosis: use of dried blood sample on filter paper. *Trans. roy Soc. trop. Med. Hyg.*, 82: 607-610, 1988.
6. COLTORTI, E.A.; FERNANDEZ, E.; MARGUET, E.R.; SCOZZINA, J.D. & GUARNERA, E. - Detección de portadores asintomáticos de quistes hidatídicos: aumento de la especificidad del ensayo inmunoenzimático. *Rev. Inst. Med. trop. S.Paulo*, 32: 275-284, 1990.
7. COLTORTI, E.A.; DELARZES, S.; CAMMARIERI, G. & FERNANDEZ, E. - Inmunodiagnóstico de hidatidosis humana: evaluación de tres tipos de ensayos inmunodiagnósticos. *Parasit. al Día*, 15: 69-73, 1991.
8. LARRALDE, C.; MONTOYA, R.M.; SCIUTTO, E.; DIAZ, M.L.; GOVEZENSKY, T. & COLTORTI, E.A. - Deciphering Western blots of tapeworm antigens (*T. solium*, *E. granulosus* and *T. crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 40: 282-290, 1989.
9. LARRIEU, E.J.; VARELA-DIAZ, V.M.; MEDINA, M.; COLTORTI, E.A. & CAVIGLIA, H. - Hidatidosis humana: aporte del inmunodiagnóstico a la detección, notificación y registro de casos en la provincia de Río Negro, Argentina. *Bol. chil. Parasit.*, 38: 3-9, 1983.

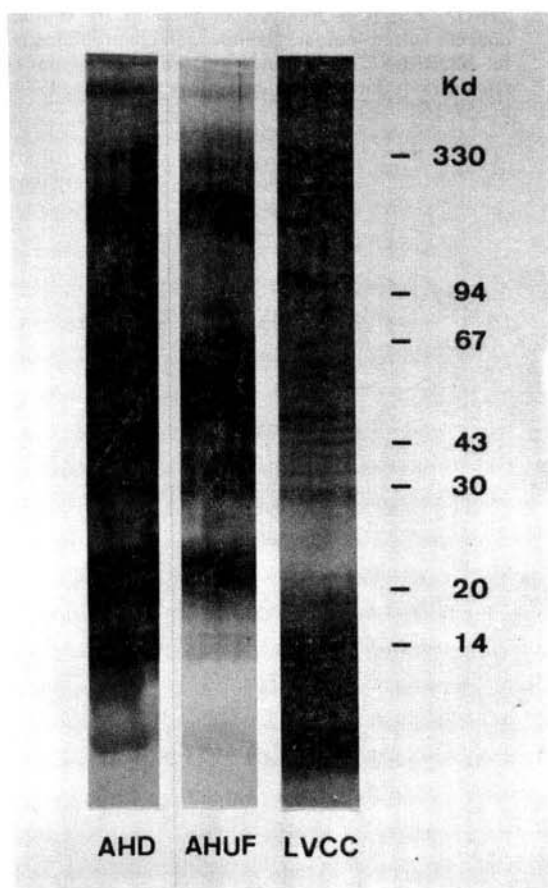


Fig.1. Análisis por SDS-PAGE del antígeno AHD, AHUF y LVCC. La cantidad de muestra aplicada fue de 2 µg de proteína por mm de ancho del pocillo de gel. Las muestras se redujeron previamente, se separaron en un gel en gradiente de 5 a 20% y se revelaron con coloración de plata. Las líneas sobre la derecha indican la ubicación de los estándares de peso molecular identificados en kilodaltons.

The frequency of distribution of the titers obtained with normal sera, hydatid sera positive to DD5 test and hydatid sera negative to DD5 test in three EIA systems was analyzed.

Results showed a significant decrease of sensitivity of the EIA using VFCC when compared to these EIA using hydatid antigens. This makes inconvenient the use of VFCC for the immunodiagnosis of hydatid disease. No significant differences between the two EIA using hydatid antigens were observed. SDS-PAGE analysis showed remarkable differences between the VFCC and the hydatid antigens composition and some differences among these latter probably due to manufacturing procedures.

10. SHEPHERD, J.C. & McMANUS, D.P. - Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Molec. Biochem. Parasit.*, 25: 143-154, 1987.
11. TSANG, V.C.W.; PERALTA, J.M. & SIMONS, R. - Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Meth. Enzymol.*, 92: 377-391, 1983.
12. ZINGALES, B. - Analysis of proteins by sodium dodecil sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: MOREL, C., ed. *Genes and antigens of parasites*. Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 1984. p. 357-363.

Recebido para publicação em 29/07/1992  
Aceito para publicação em 07/01/1993