

DETECCIÓN DE PORTADORES ASINTOMÁTICOS DE QUISTES HIDATÍDICOS: AUMENTO DE LA ESPECIFICIDAD DEL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO

E. A. COLTORTI (1), E. FERNÁNDEZ (2), E. R. MARGUET (2), J. D. SCOZZINA (2) & E. A. GUARNERA (1)

RESUMEN

Una de las actividades que realizan los programas de control de hidatidosis causada por *Echinococcus granulosus* en la República Argentina es la búsqueda de portadores asintomáticos de quistes hidatídicos entre la población general que habita las áreas de riesgo, mediante un ensayo inmunoenzimático (EIE) con antígeno de líquido hidatídico total (EIE-ALHT) que selecciona los posibles portadores. En base a la experiencia recogida se ha observado que dependiendo de la prevalencia del área, entre el 10% y el 30% de las personas seleccionadas por el EIE con valores de densidad óptica ($DO \geq \overline{DO} + 4S$) no presentan imágenes compatibles con quistes hidatídicos. El propósito del estudio fue mejorar la especificidad de la prueba. Con ese fin, se evaluó la influencia de la modificación de la oferta antigénica y el efecto de la absorción de los anticuerpos anti-componentes séricos ovinos y anti-fosforilcolina de los sueros en estudios. 114 sueros no hidatídicos seleccionados por su alto nivel de reacciones cruzadas en EIE-ALHT y 118 sueros hidatídicos se estudiaron frente a 4 fracciones antigénicas de líquido hidatídico ovino. El EIE que empleó la fracción antigénica S2B conjuntamente con la absorción previa de los sueros (EIE-S2B/A) fue el sistema que mejor discriminó los sueros hidatídicos de los no hidatídicos con altos niveles de anticuerpos no relacionados con la presencia de quistes. Se propone el empleo del sistema EIE-S2B/A para la búsqueda a campo de portadores asintomáticos de quistes hidatídicos en reemplazo del EIE-ALHT actualmente en uso. Las 4 fracciones antigénicas fueron analizadas por doble difusión y SDS-PAGE. La fracción S2B se caracterizó como enriquecida en componentes parasitarios de menos de 30 Kd entre los cuales se encontrarían el antígeno B y subunidades o fragmentos del antígeno 5.

UNITERMOS: Hidatidosis; *E. granulosus*; Seroepidemiología; Inmunodiagnóstico.

INTRODUCCION

En varias provincias de la República Argentina se llevan a cabo programas de control de la hidatidosis causada por *Echinococcus granulosus*^{10, 11}. Estos programas incluyen un subpro-

grama de atención a las personas que entre otras actividades realizan la búsqueda de pacientes asintomáticos entre la población de alto riesgo con la finalidad de tratarlos precozmente.

(1) Centro Panamericano de Zoonosis, Programa de Salud Pública Veterinaria, OPS/OMS, C.C. 3092, Correo Central, 1000 Buenos Aires, Argentina.

(2) Departamento de Control de Patologías Prevalentes, Subsecretaría de Salud, 9103 Rawson, Chubut, Argentina.

La estrategia de búsqueda de portadores asintomáticos se basa en encuestas serológicas entre la población general de las áreas de riesgo, empleando un ensayo inmunoenzimático (EIE). Las personas cuyo suero presenta valores de densidad óptica (DO) iguales o superiores a la media aritmética de la población más 4 desvíos estándar ($\geq \overline{DO} + 4S$), son considerados posibles portadores asintomáticos de quistes hidatídicos. Este EIE fue originalmente diseñado para seleccionar un segmento de la población dentro del cual estuvieran incluidos todos los portadores de quistes hidatídicos que fuesen positivos a la prueba de doble difusión arco 5 (DD5)³. La estrategia original de búsqueda estaba basada solamente en serología y consistía en tamiz con EIE y confirmación con DD5; los portadores asintomáticos con DD5 negativa no eran detectados⁴.

Con la difusión y el aumento de la disponibilidad del diagnóstico por imágenes la estrategia de búsqueda se modificó y en la actualidad las personas seleccionadas por EIE son derivadas a los hospitales regionales para realizar un examen clínico y complementar los estudios mediante DD5, y un examen básico por imágenes: Rayos X de Tórax y ecografía abdominal. Cuando hay sospecha clínica de la presencia de un quiste en otra localización se realizan los estudios por imágenes complementarios⁵. En base a estos estudios posteriores las personas seleccionadas por EIE pueden generalmente agruparse en: a) DD5 positivo e imágenes compatibles, b) DD5 negativo e imágenes compatibles y c) DD5 negativa y ausencia de imágenes compatibles. En los 2 primeros grupos se continúa con las conductas diagnósticas y terapéuticas que correspondan a cada caso, mientras que las personas DD5 negativas y sin imágenes compatibles son consideradas como no portadoras de quistes hidatídicos y por lo tanto no se toma ninguna otra acción. En base a la experiencia recogida en la aplicación de este esquema se estima que las personas con EIE positivo ($\geq \overline{DO} + 4S$), DD5 negativo y sin imágenes compatibles, constituyen aproximadamente entre el 10% y el 30% del total seleccionado por EIE según la prevalencia del área estudiada. Para los programas sería conveniente que en la selección de posibles portadores asintomáticos se usara un EIE que no seleccionara a personas DD5 ne-

gativos en las cuales no se detectan imágenes compatibles en estudios básicos, ya que ello aumenta los costos operativos sin incrementar la detección de casos.

El propósito del presente trabajo, fue estudiar la posibilidad de eliminar o disminuir la participación en el EIE de aquellos anticuerpos que positivizan la prueba y no están relacionados a la presencia de quistes hidatídicos. El estudio se realizó en sueros de personas con altos niveles de anticuerpos anti-antígeno hidatídico, en las cuales no fue posible detectar la presencia de quistes hidatídicos y en sueros de pacientes con hidatidosis confirmada. Se evaluó la influencia de la modificación de la oferta antigénica comparando 4 fracciones de líquido hidatídico ovino con el antígeno hidatídico total usado actualmente y el efecto de la absorción previa de anticuerpos anticomponentes sericos ovinos y anti-fosforil colina en los valores de DO del EIE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sueros Humanos

Se escogieron para el estudio los sueros de 232 personas que habían sido seleccionadas como posibles portadoras asintomáticas de quistes hidatídicos en las encuestas de población general, que realizó el programa de la Provincia de Chubut, durante los años 1987-1988. Los 232 sueros habían mostrado valores de DO iguales o mayores a la DO media más 5 desvíos estándar ($\geq \overline{DO} + 5S$) respecto de la población de la cual formaban parte cuando se estudiaron mediante el EIE descrito anteriormente^{3, 4}. De acuerdo al esquema seguido por el programa estas 232 personas se sometieron a un examen clínico y a estudios complementarios con DD5, Rx de tórax y ecografía abdominal. Eventualmente, cuando había sospecha clínica de un quiste en otra localización, se hicieron otros estudios por imágenes. Como resultado de estos estudios 118 personas presentaron imágenes compatibles con quistes hidatídicos, 92 de ellas fueron DD5 positivas y 98 recibieron tratamiento quirúrgico. A los fines del estudio los sueros de todas estas personas serán considerados hidatídicos. Las 114 personas restantes fueron DD5 negativas y no presentaron imágenes compatibles con quistes hidatídicos, a los fines del estudio los sueros de estas

personas serán considerados no hidatídicos seleccionados por sus altos niveles de reactividad cruzada. Todos los sueros se estudiaron por EIE absorbidos simultáneamente con suero normal ovino y fósforil colina, y sin absorber.

Antígenos Hidatídicos

Para la preparación de los antígenos se empleó líquido hidatídico total (LHT) obtenido de quistes desarrollados naturalmente en ovinos².

El antígeno de líquido hidatídico total (ALHT) se preparó y controló como se describiera anteriormente^{2, 7}.

Las cuatro fracciones antigénicas restantes se prepararon siguiendo en parte el procedimiento descrito por ORIOL et al.¹⁴ con modificaciones (Fig. 1). El LHT se centrifugó a 2000 g, el sobrenadante se concentró por liofilización, se rehidrató con buffer ácido acético/acetato de sodio, 0.005 M, pH 5.5, en un volumen correspondiente a un décimo del original y se dializó contra el mismo buffer durante 24 horas a 4°C con agitación. El líquido de diálisis se cambió 4 veces, el volumen total de líquido de diálisis respecto al producto dializado fue de 100 a 1. Finalizada la diálisis, se observó un fino precipitado que enturbiaba la solución. El producto dializado se centrifugó a 160.000 g durante 30 minutos a 4°C. Se denominó S1A al sobrenadante de la centrifugación y P1B al precipitado. El S1A se dializó contra solución salina tamponada con fosfatos (C1Na 0,15 M, PO₄HK₂/PO₄H₂K 0,01 M) pH 7,4 (SSF) y se precipitó con sulfato de amonio a una concentración final del 40% durante 2 horas a 4°C. El precipitado, denominado P2A se separó por centrifugación del sobrenadante que se denominó S2A. S2A se dializó exhaustivamente frente a SSF. P2A se disolvió con agua destilada y se dializó exhaustivamente contra SSF. El P1B se resuspendió en buffer ácido acético/acetato de sodio 0.005 M pH 5.5 y se centrifugó nuevamente a 160.000 g 30 minutos, 4°C. El P1B lavado se resuspendió en SSF pH 8,8 y se centrifugó a 160.000 g durante 30 minutos a 4°C, el precipitado insoluble se descartó y el sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio a una concentración final del 40% durante 2 horas a 4°C. El precipitado separado por centrifugación se denominó P2B y el sobrenadante se denominó

S2B. El S2B se dializó exhaustivamente contra SSF. El P2B se disolvió con agua destilada y se dializó exhaustivamente contra SSF.

El contenido en proteína de las diferentes preparaciones se cuantificó por el método de Lowry y el análisis cualitativo se hizo por SDS-PAGE con coloración de plata.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Las muestras, conteniendo entre 1 y 4 µg/µl, se trataron a 65°C durante 15 minutos en buffer Tris/HCl 0.01 M pH 6.8 con 2,5% de SDS; 5% de 2 mercaptoetanol, 10% 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 de Pharmacia según las instrucciones del fabricante.

El SDS-PAGE se realizó de acuerdo al procedimiento de LAEMMLI con modificaciones^{9, 23}. Se usaron geles de 1 mm de espesor, y 20 cm de largo con un gel de concentración de 3,5% y un gel de separación en gradiente de 5 a 20%. La electroforesis se realizó a 40 mA/300 V durante aproximadamente 4,5 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 al²⁰.

Doble difusión arco 5 (DD5)

La prueba se realizó e interpretó como se describiera anteriormente⁷.

Anticuerpos Monoclonales (AcMo)

Las diferentes preparaciones antigénicas fueron analizadas por doble difusión para tratar de identificar uno de los epitopes del arco 5 mediante el AcMo 3ES gentilmente cedido por el Dr. Giuseppe Vicari⁸. Las fracciones se estudiaron a concentraciones que oscilaron entre 1 y 10 mg/ml.

Ensayo inmunoenzimático (EIE)

El EIE empleando ALHT se realizó según se describiera previamente^{3, 4}. Las condiciones de trabajo del EIE cuando se usaron los antígenos

nos P2A, S2A, P2B y S2B se optimizaron y estandarizaron previamente mediante curvas dosis respuesta en las cuales se ensayaron placas Immulon I y II (Dynatech Lab. Inc.), y se estudio la concentración óptima de cada antígeno, conjugado, sistemas indicadores, tiempo de incubación y el comportamiento de los sueros controles para cada caso. Las condiciones de trabajo que se describen a continuación son las que resultan óptimas para cada sistema.

Las placas se sensibilizaron colocando en cada pocillo 50 μ l de antígeno diluido en buffer carbonato 0.1 M pH 9.6 durante 18 horas a 4°C en cámara húmeda. Los antígenos P2A, P2B se usaron a 1 μ g/ml y el S2B a 5 μ g/ml en placas Immulon I. El antígeno S2A se uso a 10 μ g/ml en placas Immulon 2. El exceso de antígeno se eliminó invirtiendo las placas y haciendo tres lavados sucesivos de 3 minutos cada uno con 200 μ l de SSF pH 7,2 con 0,5% de Tween 20 (SST/T 0.5). En el caso de los antígenos P2A y P2B fue necesario saturar las placas con 50 μ l por pocillo de una solución de albúmina bovina a 20 μ g/ml durante 1 hora a 37°C. Ello no fue necesario cuando se uso el antígeno S2B o S2A.

A continuación de los lavados se colocó en las placas 50 μ l de una dilución 1:100 de los sueros en estudio y controles. Los sueros controles siempre se diluyeron con SSF/T 0.5. Los sueros en estudio se diluyeron con SSF/T 0.5 (sueros no absorbidos) o con una solución de ClNa 0,15 M tamponada con Tris 0,01 M pH 7,2, con 0,5% de Tween 20 (SST/T 0.5), con 1% de suero normal ovino y 10 mM de fosforil colina (sueros absorbidos).

Los pocillos correspondientes al blanco de reactivos se cargaron con 50 μ l de SSF/T 0.5. Las placas se incubaron en cámara húmeda a 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 μ l de conjugado (suero anti IgG, IgA, IgM humanas (H + L) conjugadas con peroxidase) diluido con SSF/T 0.5 a la concentración elegida en cada caso.

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 ca-

da pocillo 100 μ l de reactivo sustrato-indicador (12 ml de ácido cítrico 0,05 M, pH 3,5 + 50 μ l H₂O₂ 0,5 M + 50 μ l ABTS 40 mM) (ABTS: 2,2' azino-di (3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid, Sigma) previamente termostatzado a 37°C y se incubó en cámara húmeda a 37°C durante exactamente 5 minutos, se homogenizó por agitación y se continuó incubando otros 5 minutos. Concluido el tiempo, la reacción se detuvo agregando 100 μ l de ácido fluorhídrico 0.1 M pH 3.3 a cada pocillo. Las placas se leyeron a 410 nm en un fotocolorímetro vertical para lecturas de microplacas (MR-600 Dynatech Lab. Inc.) el cual descuenta automáticamente el valor del blanco de reactivos en cada una de las mediciones. En cada placa de 96 pocillos se emplearon 4 para el blanco control, 4 para cada uno de los tres sueros controles y en los 80 restantes se ubicaron 40 sueros en estudio por duplicado. Los 3 sueros controles: SC1, SC2 y SC3, se preparon como se describiera previamente⁴ y en EIE frente a ALHT presentaron valores de DO de 0.19, 0.41 y 1.10 respectivamente. Dado que los valores de DO para un mismo suero pueden presentar diferencias de placa a placa (dentro del día) y día a día, se corrigieron para hacerlos comparables entre si. Para ello, se usaron los sueros controles SC1, SC2 y SC3 a quienes se les adjudicaron valores constantes de DO para cada antígeno empleado. Las correcciones se realizaron con la siguiente ecuación: DO corregida del suero en estudio = DO obtenida para el suero en estudio a corregir (DO constante del suero control elegido/DO obtenida para el mismo suero control)⁴. El suero control elegido en cada caso, fue el de valor de DO más cercano al suero en estudio a corregir. Todos los valores de DO presentados estan corregidos.

Absorción de los sueros

Los sueros se absorbieron llevándolos a la dilución de trabajo 1:100 con SST/T 0.5 que contenía 1% de suero normal ovino y 10 mM de fósforil colina (Sigma).

RESULTADOS

El análisis cualitativo por SDS-PAGE del antígeno hidatídico total y de las cuatro preparaciones antigénicas obtenidas siguiendo el esquema de fraccionamiento de la figura 1, se presenta

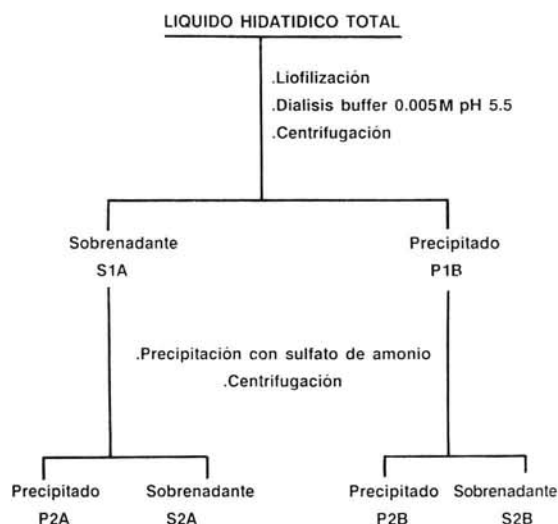


Fig. 1— Esquema de fraccionamiento empleado para obtener a partir de líquido hidatídico total, las preparaciones antigénicas estudiadas.

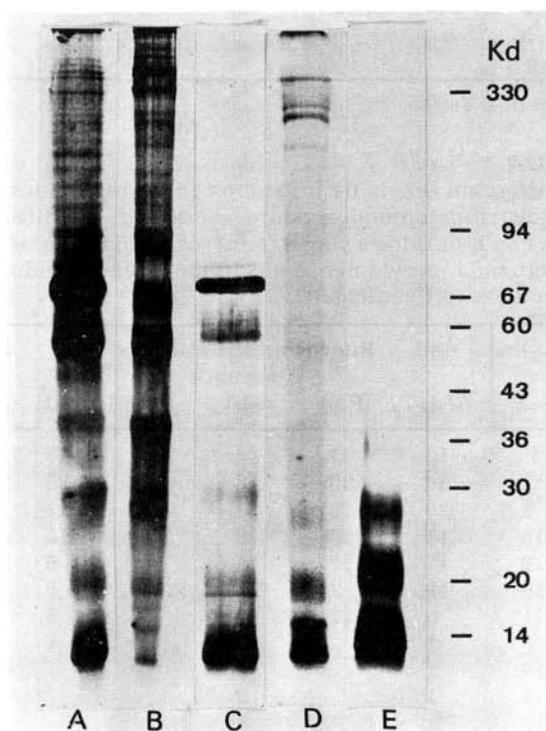


Fig. 2 — Análisis por SDS PAGE del antígeno hidatídico total (A) y las fracciones P2A (B); S2A (C); P2B (D) y S2B (E). La cantidad de muestra aplicada fue de 1.5; 1.0; 1.0; 1.0 y 1.0 μ g por mm de ancho del pocillo del gel respectivamente. Las muestras se redujeron previamente, se separaron en un gel 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.

en la figura 2. La comparación de la composición de cada una de las cuatro fracciones respecto del ALHT permite hacer las siguientes observaciones. P2A está enriquecida en la mayoría de los componentes de más de 25 Kd y es deficitaria en los de menor peso molecular. Los componentes de S2A se ubican fundamentalmente en dos zonas, una entre 55 y 80 Kd y otra de menos de 20 Kd. P2B contiene principalmente componentes de alto peso molecular y menores de 20 Kd y presenta una cantidad de componentes intermedios a baja concentración. S2B presenta fundamentalmente componentes de peso molecular menor de 30 Kd.

El análisis de las diferentes preparaciones antigénicas por doble difusión, empleando el Ac-Mo 3ES⁸ demostró la presencia de este epítopo del antígeno 5 en las fracciones P2A, P2B y S2B y su ausencia en la fracción S2A.

Los Cuadros 1 y 2 presentan la frecuencia de distribución de los valores de densidad óptica, obtenidos cuando los 118 sueros hidatídicos y los 114 sueros no hidatídicos seleccionados por sus altos niveles de reactividad cruzada, absorbidos y no absorbidos, se estudiaron por EIE frente a las cinco preparaciones antigénicas.

La ubicación y el comportamiento de la curva de distribución de los valores de DO del grupo de los 118 sueros hidatídicos y el de los 114 sueros no hidatídicos, en los 10 sistemas estudiados se presenta en la figura 3.

Cuando se comparó para cada uno de los 10 sistemas la distribución de los valores de densidad óptica en el grupo de sueros hidatídicos y no hidatídicos, mediante el método de Kolmogorov-Smirnov; el análisis mostró diferencias altamente significativas en todos los casos ($P > 0,01$). Cuando se tomaron los valores de χ^2 obtenidos en esas comparaciones para cada uno de los sistemas, como un índice del grado de discriminación entre los grupos de sueros hidatídicos y no hidatídicos se observó que: a) en los 5 antígenos empleados la absorción previa del suero mejora la discriminación entre ambos grupos; b) el antígeno S2B es el que mejor discrimina, tanto en la serie de sueros absorbidos como no absorbidos (Cuadro 3).

CUADRO 1

Efecto de la variación de la oferta antigénica en los resultados del ensayo inmunoenzimático (EIE). Frecuencia de distribución de los valores de densidad óptica obtenidos en EIE al estudiar 118 sueros de pacientes con hidatidosis y 114 sueros no hidatídicos seleccionados por sus altos niveles de reactividad cruzada, empleando cinco diferentes preparaciones antigénicas.

Densidad Optica	Sueros Hidatídicos Antígenos					Sueros no Hidatídicos Antígenos				
	ALHT	P2A	S2A	P2B	S2B	ALHT	P2A	S2A	P2B	S2B
0.00 — 0.10							1		1	2
0.11 — 0.20							7		4	3
0.21 — 0.30				1			34		17	8
0.31 — 0.40		14		9		3	29		40	14
0.41 — 0.50	1	21	1	14	3	15	30		34	22
0.51 — 0.60	11	29	4	29	8	24	12	11	15	28
0.61 — 0.70	6	31	7	21	12	26	1	27	3	15
0.71 — 0.80	11	19	15	21	13	27		21		12
0.81 — 0.90	10	4	17	16	17	12		25		9
0.91 — 1.00	13		19	5	15	6		16		1
1.01 — 1.10	18		18	2	15	1		5		
1.11 — 1.20	20		15		12			4		
1.21 — 1.30	16		9		9			4		
1.31 — 1.40	7		7		6			1		
1.41 — 1.50	2		5		5					
1.51 — 1.60	3		1		3					
1.61 — 1.70										

CUADRO 2

Efecto de la variación de la oferta antigénica y la absorción previa de los sueros en los resultados del ensayo inmunoenzimático (EIE). Frecuencia de distribución de los valores de densidad óptica obtenidos en EIE al estudiar 118 sueros de pacientes con hidatidosis y los 114 sueros no hidatídicos seleccionados por sus altos niveles de reactividad cruzada, previamente absorbidos*, empleando cinco diferentes preparaciones antigénicas.

Densidad Optica	Sueros Hidatídicos Antígenos					Sueros no Hidatídicos Antígenos				
	ALHT	P2A	S2A	P2B	S2B	ALHT	P2A	S2A	P2B	S2B
0.00 — 0.10	1			2		13	31	4	25	43
0.11 — 0.20		2		1	2	30	36	8	37	25
0.21 — 0.30	4	10	1	12	3	20	18	21	22	21
0.31 — 0.40	8	8	2	10	15	11	16	18	16	10
0.41 — 0.50	6	17	4	19	12	17	10	14	8	6
0.51 — 0.60	6	25	8	19	10	12	2	13	6	5
0.61 — 0.70	12	23	11	17	11	6	1	14		3
0.71 — 0.80	12	18	12	16	8	1		9		1
0.81 — 0.90	17	10	18	12	14	1		9		
0.91 — 1.00	11	3	13	7	14	1		3		
1.01 — 1.10	11	2	14	3	10					
1.11 — 1.20	14		11		6			1		
1.21 — 1.30	10		24		5					
1.31 — 1.40	6				6					
1.41 — 1.50					1					
1.51 — 1.60					1					
1.61 — 1.70										

* Los sueros se absorbieron previamente con suero normal ovino y fosforil colina.

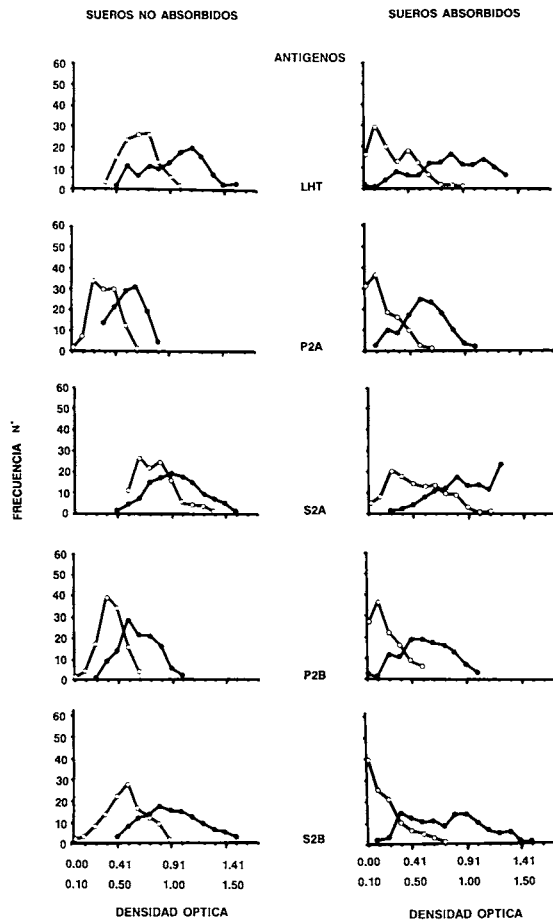


Fig. 3 — Ubicación y comportamiento de las curvas de distribución de frecuencia de los valores de densidad óptica (DO) obtenidos en el ensayo inmunoenzimático (EIE) para el grupo de los 118 sueros hidatídicos (—●—●—●—), y en los 114 sueros no hidatídicos seleccionados por sus altos niveles de reactividad cruzada (—○—○—○—), en los 10 sistemas estudiados. Los valores de DO se presentan agrupados en intervalos de 0,10 unidades.

CUADRO 3

Diferencias entre la distribución de frecuencia de los valores de densidad óptica (DO) obtenidos en el ensayo inmunoenzimático (EIE) entre los grupos de sueros hidatídicos y no hidatídicos seleccionados por sus altos niveles de reactividad cruzada. Los sueros absorbidos y sin absorber se estudiaron frente a los 5 antígenos empleados. Valores de χ^2 (Kolmogorov-Smirnov) para cada uno de los 10 sistemas estudiados ($P > 0,01$).

Antígenos	Sueros	
	No absorbidos	Absorbidos
LHOT	78.6	128.1
P2A	61.6	122.8
S2A	23.4	93.5
P2B	60.7	94.0
S2B	104.5	135.5

DISCUSION

Las 232 personas cuyos sueros se emplearon en este estudio fueron seleccionados en encuestas de población por haber presentado en EIE, usando el ALHT, valores $DO \geq \overline{DO} + 5S$. Estudios posteriores demostraron que 118 de esas personas presentaban quistes hidatídicos mientras que en las 114 restantes no pudieron demostrarse quistes. El análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio está dirigido a conocer en que medida el uso de alguna de las fracciones antigénicas estudiadas y la absorción previa de los sueros disminuiría la detección de anticuerpos no relacionados con la presencia de quistes hidatídicos y en consecuencia aumentaría la proporción de hidatídicos entre las personas seleccionadas.

Comparando el efecto de la oferta antigénica en los resultados de EIE para ambos grupos de sueros (Cuadro 1) puede observarse que en los casos de las fracciones P2A, P2B y S2B hay una significativa disminución en los valores de DO de algunos de los sueros no hidatídicos. Ello indicaría que se habría eliminado de esas fracciones algunos antígenos que reaccionan con anticuerpos no relacionados a la presencia de quistes hidatídicos. En el caso de la fracción S2A se observa una concentración de los valores de DO en el centro de la escala lo cual podría interpretarse como que esa fracción contiene una elevada proporción de antígenos que reaccionan con anticuerpos no relacionados a la presencia de quistes hidatídicos. Ninguno de los 118 sueros hidatídicos presentó frente a la fracción P2A valores de DO menores de 0,31, si tomamos este valor como nivel de corte para esa fracción, 42 sueros no hidatídicos quedarían por debajo y podrían diferenciarse de los hidatídicos. Si se hace idéntico análisis para P2B y S2B; 5 y 27 sueros de los 114 no hidatídicos podrían ser diferenciados y no serían seleccionados por el EIE.

Macromoléculas de diversos pesos moleculares portadoras del hapteno fosforilcolina (FC) han sido detectadas tanto en extractos como en productos de excreción-secreción de origen parasitario. Este hapteno está ampliamente distribuido en la naturaleza y se lo considera como una de las causas de las reacciones cruzadas que se observan en inmunodiagnóstico de enferme-

dades parasitarias^{13, 15, 21}. SHEPHERD y McMANUS¹⁸ identificaron el hapteno FC asociado a macromoléculas del líquido hidatídico y sugirieron su presencia en el antígeno 5. El líquido hidatídico empleado en la preparación de los antígenos contiene componentes séricos de la especie de la cual se obtuvieron los quistes, y se ha sugerido que estos componentes podrían ser causa de reacciones cruzadas^{6, 16, 22}. Se ha observado en población general anticuerpos contra proteínas de origen animal¹⁹.

En estudios no publicados realizados en este laboratorio, hemos detectado por EIE en población rural general, anticuerpos antiproteínas séricas ovinas que en algunas personas alcanzan niveles que podrían ser causa o contribuir a producir reacciones cruzadas. Comparando el efecto de la absorción previa de los sueros con SNO y FC asociado a la oferta antigénica, en los resultados de EIE, se observa que para todos los antígenos empleados hay una significativa disminución de los valores de DO en ambos grupos de sueros (Cuadro 2). Ello indicaría que en ambos grupos había sueros que contenían anticuerpos anti SNO y/o FC y que su neutralización previa produjo el descenso de los valores de DO. La disminución de los valores de DO es mucho más marcada en el grupo de los sueros no hidatídicos aumentando de esa forma la proporción de sueros de este grupo que pueden discriminarse respecto del grupo de los hidatídicos.

La marcada disminución de DO de algunos sueros hidatídicos podría interpretarse como que en realidad una proporción de los anticuerpos que estaban siendo detectados no eran producto de la estimulación por parte del quiste sino de otro origen. Los resultados del análisis por KOLMOGOROV-SMIRNOV (Cuadro 3) indican que la absorción mejora la discriminación de ambos grupos con todos los antígenos empleados. El aumento de la discriminación del sistema S2A-absorción (EIE-S2A/A) frente al S2A sin absorber indicaría la presencia de una alta proporción de componentes séricos ovinos y/o moléculas portadoras del haptene FC en esa fracción. P2A/A, P2B/A y S2B/A son los sistemas que concentran mayor número de sueros del grupo no hidatídico en los tres primeros intervalos de DO del Cuadro 2. Analizando la relación, sueros hidatídicos que no se seleccionan/sueros no

hidatídicos que no se seleccionan para niveles de corte de DO de 0,10, 0,20 y 0,30 tendríamos respectivamente para los sistemas P2A/A: 0/31, 2/67, 12/85; P2B/A: 2/35, 3/62, 15/84 y S2B/A: 0/45, 2/68, 5/89.

De los resultados analizados surge que el sistema EIE que empleó como antígeno la fracción S2B conjuntamente con la absorción previa de los sueros con SNO y FC (EIE-SB/A) es el que mejor discrimina los sueros hidatídicos de los no hidatídicos con altos niveles de anticuerpos no relacionados a la presencia de quistes hidatídicos y permite aconsejar su uso para búsqueda a campo de portadores asintomáticos de quistes hidatídicos en reemplazo del sistema EIE-LHT actualmente en uso. Las evaluaciones del uso a campo del sistema EIE-S2B/A están siendo realizadas actualmente.

Los dos antígenos mayores contenidos en el LHT son los identificados como antígeno 5¹ y antígeno B¹⁴. El antígeno 5 puede presentarse como un polímero de hasta 400 Kd formado por subunidades de aproximadamente 60 Kd las cuales en condiciones de reducción dan origen a 2 moléculas de 40 y 20 Kd. El antígeno B puede presentarse como un polímero de hasta aproximadamente 150 Kd formado por subunidades de 10 a 20 Kd que no son afectadas en condiciones de reducción^{16, 17, 18}. DE FELICE y cols⁸ estudiaron mediante SDS-PAGE en condiciones de reducción y no reducción el precipitado del líquido hidatídico obtenido por diálisis frente a buffer acético/acetato 0,005 M pH 5,0 (P1B, fig. 1) y concluyeron que contiene el antígeno B, el antígeno 5, globulinas de la especie de la cual se obtuvieron los quistes y contaminantes menores. En el presente estudio la precipitación de P1B con sulfato de amonio al 40% según ORIOL y cols¹⁴ a permitido obtener dos fracciones: P2B, que contiene algunos componentes de bajo peso molecular y concentra los contaminantes séricos de alto peso molecular, y S2B, con muy poca contaminación sérica y enriquecida en componentes de peso molecular inferior a 30 Kd (fig. 2). El análisis por doble difusión empleando el AcMo 3E5 demostró que en ambas fracciones esta presente el epítipo del antígeno 5 que reconoce este monoclonal.

La composición probable de la fracción S2B podría definirse como una muestra enriquecida

en componentes parasitarios de menos de 30 Kd entre los cuales se encontrarían el antígeno B y subunidades o fragmentos del antígeno 5, y una muy ligera contaminación con componentes séricos de la especie de la cual se obtuvieron los quistes. SHEPHERD y McMANUS¹⁸ mediante estudios por radioinmunoprecipitación, SDS-PAGE-transferencia y revelado por autorradiografía observaron con sueros humanos normales reacciones cruzadas con diversas poblaciones moleculares del LHT destacando las de 68, 55, 38 y 20 Kd, mientras que antígenos de 12 y 16 Kd no presentaban reacciones cruzadas con sueros de pacientes con otras parasitosis relacionadas. Recientemente MADDISON y cols¹² empleando con fines diagnósticos un EIE sobre membranas de nitrocelulosa a las que se había transferido LHT previamente separado en SDS-PAGE han identificado anticuerpos dirigidos contra un antígeno de aproximadamente 8 Kd que sería específico para hidatidosis causado por *E. granulosus*. Es probable que tanto estos componentes parasitarios de bajo peso molecular considerados específicos como los de 20 Kd responsables de reacciones cruzadas estén contenidos en S2B junto con otros componentes parasitarios menores de especificidad desconocida. La fracción S2B es de fácil y económica obtención y sería una buena preparación como punto de partida para purificar estos antígenos considerados específicos o para ser usada en la producción de tiras de nitrocelulosa por SDS-PAGE-electrotransferencia para ser empleadas en EIE con fines diagnósticos.

SUMMARY

Detection of asymptomatic hydatid cysts carriers by an enzymatic immunoassay.

An enzyme immunoassay (EIE) as a screening test to select potential asymptomatic cyst carriers among the general population of areas under risk is being used in programs for the control of hydatid diseases caused by *Echinococcus granulosus* in Argentina. The experience obtained up to date, applying this assay in population surveys, indicates that depending on the prevalence in the area 10% to 30% of the individuals selected did not show images compatible with hydatid cysts. The purpose of the present study was to improve the specificity of the test. To

this purpose, the influence of the modification of the antigenic availability and the effect of the absorption from the serum samples of antibodies anti-normal ovine sera and anti-phosphorylcholine was evaluated. One hundred and fourteen non hydatid sera selected because of their high cross reactivity in EIE using the whole hydatid antigen (WHA) and 118 hydatid sera, were studied with four fractions of ovine hydatid cyst fluid. The EIE employing the S2B antigenic fraction with previous absorption of the sera (EIE-S2B/A) was the system that discriminated better hydatid sera from non hydatid sera with high levels of cross reactivity. The replacement of the EIE employing WHA by the EIE-S2B/A system, for the active search of asymptomatic cyst carriers in field conditions, is proposed. The four antigenic fractions were analyzed by double diffusion and SDS-PAGE. The S2B fraction revealed a high content of parasitic components of less than 30 Kd which probably includes antigen B and subunits or fragments of antigen 5.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sr. Roberto O. García por su esmerada colaboración técnica. Al Dr. Giuseppe Vicari por habernos cedido gentilmente el anticuerpo monoclonal 3E5 y al Dr. Naum Marchewsky por su colaboración en el análisis estadístico.

REFERENCIAS

1. CAPRON, A.; VERNES, A. & BIGUET, J. — Le diagnostic immunoelectrophorétique de l'hydatisose. In: *Le kyste hydatique du foie. Journnales Lyonnaises d'hydatisologie*. Lyon, Simep, 1967. p. 27-40.
2. CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS, OPS/OMS. Diagnóstico inmunológico de la hidatidosis humana mediante la prueba de doble difusión arco 5. Ramos Mejia, Buenos Aires, Centro Panamericano de Zoonosis, 1979. 40 p. Nota Técnica, N° 22.
3. COLTORTI, E. A. — Standardization and evaluation of an enzyme immunoassay as a screening test for the seroepidemiology of human hydatidosis. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 35: 1000-1005, 1986.
4. COLTORTI, E. A.; FERNÁNDEZ, E.; GUARNERA, E.; LAGO, J. & IRIARTE, J. — Field evaluation of an enzyme immunoassay for detection of asymptomatic patients in a 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 samples on filter paper. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 82: 607-610, 1988.
6. COLTORTI, E. A. & VARELA DÍAZ, V. M. — IgG levels and host specificity in hydatid cyst fluid. *J. Parasit.*, 58: 753-756, 1972.
7. COLTORTI, E. A. & VARELA DÍAZ, 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.
8. DI FELICE, G.; PINI, C.; AFFERNI, C. & VICARI, G. — Purification and partial characterization of the mayor antigen of *Echinococcus granulosus* (antigen 5) with monoclonal antibodies. *Molec. Biochem. Parasit.*, 20: 133-142, 1986.
9. LAEMMLI, U. K. — Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
10. LARRIEU, E.; DE ZABALETA, O.; IRIARTE, J. & BITSCH, A. — Sistema de vigilancia epidemiológica de la hidatidosis en la región patagónica argentina. *Vet. argent.*, 2: 843-853, 1985.
11. LARRIEU, E.; RODRÍGUEZ JAUREGUI, J.; ODRIOZOLA, M. & MEDINA, M. — Epidemiología de la hidatidosis humana en la Provincia de Río Negro. *Acta gastroent. latinoamer.*, 16: 93-108, 1986.
12. MADDISON, S. E.; SLEMENDA, S. B.; SCHANTZ, P. M.; FRIED, J. A.; WILSON, M. & TSANG, V. C. W. — A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 Kda. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 40: 337-383, 1989.
13. MAIZELS, R. M.; BURKE, J. & DENHAM, D. A. — Phosphorylcholine-bearing antigens in filarial and infection sera from *Brugia malayi* and *B. pahangi*. *Paras. Immunol.*, 9: 49-66, 1987.
14. ORIOL, R.; WILLIAMS, J. F.; PÉREZ ESANDI, M. & ORIOL, C. — Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 20: 569-575, 1971.
15. PERY, P.; LUFFAU, G.; CHARLEY, J.; PETIT, A.; ROUZE, P. & BERNARD, S. — Phosphorylcholine antigens form *Nippostrongylus brasiliensis*. I. Anti-phosphorylcholine antibodies in infected rats and locations of phosphorylcholine antigens. *Ann. Immunol. (Paris)*, 130C: 879-888, 1979.
16. PIANTELLI, M.; POZZUOLI, R.; ARRU, F. & MUSIANI, P. — *Echinococcus granulosus*: identification of subunits of the mayor antigens. *J. Immunol.*, 119: 1382-1386, 1977.
17. POZZUOLI, R.; PIANTELLI, M.; PERUCCI, C.; ARRU, E. & MUSIANI, P. — Isolation of the most immunoreactive antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *J. Immunol.*, 115: 1459-1463, 1975.
18. SHEPHERD, J. C. & McMANUS, D. P. — Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Molec. Biochem. Parasit.*, 25: 143-154, 1987.
19. TERRY, D. & BRUNELL, P. — Anti-bovine antibody in human sera as a cause of nonspecificity in enzyme immunoassay. *J. clin. Microbiol.*, 25: 987-990, 1987.
20. 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.
21. UBEIRA, F. M.; LEIRO, J.; SANTAMARINA, M. T.; VILLA, T. G. & SAN MARTIN-DURÁN, M. L. — Immune response of *Trichinella* epitopes; the antiphosphorylcholine plaque-forming cell response during the biological cycle. *Parasitology*, 94: 543-553, 1987.
22. VARELA DÍAZ, V. M.; COLTORTI, E. A.; RICARDES, M. I.; GUISANTES, J. A.; YARZABAL, L. A. — The immunoelectrophoretic characterization of sheep hydatid cyst fluid antigens. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 23: 1092-1096, 1974.
23. ZINGALES, B. — Analysis of proteins by sodium dodecyl 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 23/10/1989.