

INDICE

I.- INTRODUCCION	1
I.1.- Hidatidosis: generalidades	1
I.2.- Distribución y prevalencia	3
I.3.- Ciclo biológico del parásito	6
I.4.- Interacción parásito-hospedador	12
I.5.- Diagnóstico de la hidatidosis	18
I.6.- Modelo de infección secundaria	26
I.7.- Fundamentación del presente trabajo	29
II.- MATERIALES Y METODOS	34
II.1.- Materiales	34
II.1.1. Preparación de antígeno de líquido hidático bovino (AgLHB)	34
II.1.2. Preparación de antígeno de líquido hidático bovino purificado (AgLHBp)	35
II.1.3. Protoescólices (PE) de <i>Echinococcus granulosus</i>	35
II.1.4. Animales	36
II.1.4.1. Ratones	36
II.1.4.2. Conejos	36
II.1.5. Sueros normales	37
II.1.5.1. Sueros normales de ratón	37
II.1.5.2. Suero bovino normal	37
II.1.5.3. Suero normal de conejo	37

II.1.5.4. Sueros humanos de donantes sanos	37
II.1.6. Antisueros	37
II.1.6.1. Preparación de antisuero anti- inmunoglobulinas de ratón	37
II.1.6.2. Preparación de antisuero anti-AgLHBp	38
II.1.6.3. Preparación de antisuero anti-AgLHB	39
II.1.7. Preparación de inmunoglobulinas anti-AgLHBp purificadas por afinidad	39
II.1.8. Preparación de inmunoglobulinas de conejo	40
II.1.9. Preparación de conjugados enzimáticos	40
II.1.9.1. Preparación de inmunoglobulinas de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugadas a peroxidasa	40
II.1.9.2. Preparación de anticuerpos anti-AgLHBp conjugados a peroxidasa	41
II.1.9.3. Anti-inmunoglobulinas humanas conjugadas a peroxidasa	41
II.1.9.4. Anti-IgG de ratón conjugadas a fosfatasa alcalina	41
II.1.10. Estándares	42
II.1.10.1. Preparación de estándar de referencia inmunoglobulinas de ratón anti-AgLHB	42
II.1.10.2. Preparación de estándar AgLHB en suero normal de ratón	43
II.1.10.3. Estándar de peso molecular	43
II.1.10.4. Estándar de anticuerpos anti-hidáticos humanos	43

II.1.10.5. Preparación de estándar de AgLHB en suero normal humano	43
II.2.- Métodos	44
II.2.1. Diseño experimental	44
II.2.2. Obtención de sueros	45
II.2.2.1. Murinos	45
II.2.2.2. Humanos	45
II.2.3. ELISA	46
II.2.4. Recuperación de placas de ELISA	47
II.2.5. Determinación de las condiciones óptimas de sensibilización de las placas de ELISA con AgLHB	47
II.2.5.1. Estudio de la concentración óptima de AgLHB para sensibilizar las placas de acuerdo a su comportamiento posterior en ELISA	47
II.2.5.2. Estudio de la concentración óptima de AgLHB para sensibilizar las placas según la técnica de saturación con peroxidasa	49
II.2.6. Control de conjugados y determinación de la concentración óptima a usar	50
II.2.6.1. Anti-gamma globulinas de ratón conjugadas a peroxidasa	50
II.2.6.2. Anticuerpos anti-AgLHBp conjugados a peroxidasa	50
II.2.7. Determinación de anticuerpos totales anti-AgLHB en ratones	51

II.2.8. Determinación de antígeno circulante en suero de ratones	52
II.2.9. Determinación de la respuesta en anticuerpos de ratón contra epitopos peptídicos y glucídicos	53
II.2.10. Patrón de antígenos parasitarios reconocidos por los anticuerpos murinos	55
II.2.10.1. SDS-PAGE e inmunoblot con AgLHB	55
II.2.10.2. Inmunoblot con AgLHB tratado con peryodato	55
II.2.11. Estudio de componentes de líquido hidático en quistes de ratones	56
II.2.12. Determinación de la avidéz de anticuerpos de ratones	57
II.2.13. Evaluación de la infección por autopsia	58
II.2.14. Determinación de anticuerpos humanos totales anti-AgLHBp	58
II.2.15. Determinación de antígeno circulante en sueros humanos	60
II.2.16. Interferencia por Factor Reumatoideo (FR)	61
II.2.17. Modificación técnica para eliminar la interferencia por FR	62
III.- RESULTADOS	63
III.1.- Optimización de las condiciones de sensibilización de las placas de ELISA con AgLHB	63
III.1.1. Estudio de la concentración óptima de AgLHB para sensibilizar las placas de acuerdo a su comportamiento en ELISA	63

III.1.2. Estudio de la concentración óptima de AgLHB para sensibilizar las placas utilizando la técnica de saturación con peroxidasa	71
III.2.- Perfil de la respuesta en anticuerpos anti-AgLHB en ratones durante la infección experimental	77
III.3.- Evolución de los niveles de antígeno circulante en suero de ratones durante la infección experimental	81
III.4.- Perfil de la respuesta en anticuerpos específicos murinos contra epitopos peptídicos y glucídicos del AgLHB	86
III.5.- Reconocimiento antigénico de anticuerpos murinos contra AgLHB nativo y tratado con peryodato	88
III.6.- Componentes de líquido hidático en quistes de ratones	90
III.7.- Evolución de la avidéz de los anticuerpos séricos de ratones infectados	92
III.8.- Determinación de la carga parasitaria	94
III.9.- Determinación de anticuerpos específicos así como de antígeno circulante en sueros de pacientes hidáticos	104
III.10.- Seguimiento serológico post-quirúrgico de pacientes hidáticos	108
IV.- DISCUSION	119
IV.1.- Optimización de la sensibilización de las placas de ELISA con AgLHB	119
IV.2.- Perfil de anticuerpos anti-AgLHB y antígeno	

circulante en suero de ratones	126
IV.3.- Perfil de la respuesta murina contra diferentes epitopos de AgLHB	132
IV.4.- Maduración de la avidéz de los anticuerpos anti-AgLHB en ratones	138
IV.5.- Evaluación de la carga parasitaria en la infección murina experimental	140
IV.6.- Evaluación de parámetros para el mejoramiento del inmunodiagnóstico humano	142
IV.7.- Detección precoz de la reinfección en pacientes hidáticos	145
V.- CONCLUSIONES	150
VI.- BIBLIOGRAFIA	153
VII.- ANEXO Copia de la publicación en la revista Parasite Immunology, 'Antibody response of <i>Echinococcus granulosus</i> infected mice: recognition of glucidic and peptidic epitopes and lack of avidity maturation'	180