

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

WESTERN BLOT COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO DE LA
HIDATIDOSIS HUMANA, UTILIZANDO FLUIDO DEL METACESTODO DE
Echinococcus sp.

AUTOR:

DANIEL ALEXANDER RAMOS SARMIENTO

TUTORA:

VIVIANA PAMELA CHILUISA UTRERAS

Quito, marzo de 2018.

Cesión de derechos de autor

Yo, Daniel Alexander Ramos Sarmiento, con documento de identificación N° 1721533055, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: “Western Blot como método diagnóstico de la hidatidosis humana, utilizando fluido del metacestodo de *Echinococcus* sp.” mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, marzo de 2018.



.....

Daniel Alexander Ramos Sarmiento

C.I. 1721533055

Declaratoria de coautoría de la docente tutora

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, Western Blot como método diagnóstico de la hidatidosis humana, utilizando fluido del metacestodo de *Echinococcus* sp., realizado por Daniel Alexander Ramos Sarmiento, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, marzo de 2018.



.....
Viviana Pamela Chiluisa Utreras

C.I. 1713168258

Dedicatoria

A Dios todo poderoso, por ser amparo y fortaleza.

A mí madre, porque siempre me brindó su apoyo incondicional, supo sacar a nuestra familia adelante enfrentando cualquier adversidad, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ellos, hoy puedo ver alcanzada mi meta.

A mi padre y hermanos que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, impartíendome consejos de vida.

Daniel Ramos S.

Agradecimientos

Mi sincero agradecimiento a la Dra. Ana Lucía Ruano, por ser el pilar que permitió la realización de este trabajo, a la Lic. Eliana Champutiz y el Lic. Danny Asimbaya, por proporcionarme su asesoría y conocimientos.

Un agradecimiento especial a la Ing. Hipatia Criollo, Lic. Amanda Agreda, MSc. Viviana Chiluisa y MSc. Daniel Acurio por el apoyo tanto a nivel académico como personal y por los conocimientos brindados para el desarrollo de este proyecto.

Así mismo quiero agradecer a todos los analistas del programa PROPAD, amigos que de una u otra manera, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación.

Índice

Introducción	1
Marco conceptual	4
1.1 Helmintos	4
1.1.1 Platelmintos.....	5
1.2 <i>Echinococcus granulosus</i>	6
1.2.1 Taxonomía.....	6
1.2.2 Ciclo biológico	7
1.2.3 Morfología	9
1.2.4 Epidemiología	12
1.2.5 Características clínicas	14
1.2.6 Diagnóstico	15
1.2.7 Tratamiento	24
Materiales y métodos	25
2.1 Antígenos parasitarios	25
2.1.1 Obtención de la muestra parasitaria.....	25
2.1.2 Tratamiento del fluido hidatídico	26
2.1.3 Cuantificación proteica	26
2.2 Identificación morfométrica de la especie.....	27
2.3 Muestras de suero sanguíneo.....	28
2.3.1 Prueba ELISA Indirecto <i>casero</i>	28
2.3.2 Kit Comercial NovaTec NovaLisa Echinococcus IgG ELISA.....	30
2.4 Western blot	31
2.4.1 SDS PAGE.....	31
2.4.2 Electrotransferencia	33

2.4.3 Inmunodetección.....	34
2.5 Análisis estadístico	36
Resultados y discusión	38
3.1 Antígenos parasitarios	38
3.2 Identificación morfométrica de la especie <i>Echinococcus granulosus</i>	41
3.3 ELISA Indirecto <i>casero</i> para el cribado de sueros sanguíneos	43
3.4 Valoración muestras sanguíneas con Kit ELISA comercial.....	44
3.5 Identificación antígenos de <i>Echinococcus granulosus</i> por SDS PAGE.....	45
3.6. Western Blot.....	46
3.7 Análisis e interpretación de resultados	48
Conclusiones	54
Recomendaciones.....	55
Bibliografía	56

Índice de figuras

Figura 1. Equinococosis dentro de la clasificación de helmintos parásitos.	4
Figura 2. Ciclo de vida del parásito <i>Echinococcus granulosus</i>	8
Figura 3. Morfología de un quiste hidatídico de <i>E. granulosus</i>	11
Figura 4. Protoescólex de <i>E. granulosus</i> , distintas etapas de desarrollo.....	12
Figura 5. Distribución geográfica del parásito <i>Echinococcus granulosus</i> , 2011.....	13
Figura 6. Distintas lesiones hepáticas detectadas por ultrasonografía con un aspecto similar a un quiste hidatídico.	16
Figura 7. Enzimas y substratos utilizados en enzimoimmunoanálisis.	18
Figura 8. Etapas de la técnica ELISA Indirecto.	19
Figura 9. Detección enzimática específica de antígenos ligados a una membrana...	23
Figura 10. Criterios de evaluación para determinar positividad o negatividad para hidatidosis.	36
Figura 11. Hígado porcino entero infectado de hidátides uniloculares.....	38
Figura 12. Protoescólices <i>Echinococcus granulosus</i> , tinción con eosina 0,1%.	39
Figura 13. Cuantificación de proteínas presentes en el fluido hidatídico recogido. ..	40
Figura 14. Ganchos rostelares de <i>E. granulosus</i>	41
Figura 15. Identificación bandas extracto fluido hidatídico hepático porcino.....	46
Figura 16. Diagnóstico de la hidatidosis unilocular humana mediante Western blot.	47
Figura 17. Comparación de los resultados obtenidos de las tres metodologías serológicas.....	50

Índice de tablas

Tabla 1. Descripción de las especies del género <i>Echinococcus</i>	7
Tabla 2. Formulaciones geles SDS PAGE.....	32
Tabla 3. Tabla de cuatro casillas.....	37
Tabla 4. Longitud total ganchos rostellares de una muestra parasitaria del género <i>Echinococcus</i>	42
Tabla 5. Comparación individual de los resultados obtenidos de las tres metodologías serológicas.....	49
Tabla 6. Tabla de cuatro casillas, comparación resultados Western Blot y pruebas ELISA.....	50

Índice anexos

Anexo 1. Morfología estadio adulto y huevo del parásito <i>Echinococcus granulosus</i>	65
Anexo 2. Tratamiento de la muestra parasitaria, obtención y análisis del fluido hidatídico.....	66
Anexo 3. Kit QuantiPro BCA Assay Sigma Aldrich.	68
Anexo 4. Características morfométricas para la identificación de las especies del género <i>Echinococcus</i>	69
Anexo 5. Equipo lavaplaquetas Biotek Elx50 y lector BioTek ELx808 para microplacas ELISA.	71
Anexo 6. Kit Comercial NovaTec NovaLisa Echinococcus IgG ELISA.	72
Anexo 7. Equipo Labnet Enduro VE10 Vertical Gel Electrophoresis System y termociclador convencional Eppendorf.	73
Anexo 8. Agitador rotatorio SciLogex SK-L330-Pro.	74
Anexo 9. Orden dispuesto para la distribución de blanco, controles y sueros problema. Resultados Placa 1 y 2 Prueba ELISA Indirecto casero.	75
Anexo 10. Distribución blanco, controles y suero problema en pocillos del Kit Comercial NovaTec NovaLisa Echinococcus IgG ELISA. Resultados evaluación. .	78
Anexo 11. Tiras de nitrocelulosa tras la evaluación individual de sueros problema por InmunoBlot.	79

Resumen

La hidatidosis o equinococosis es una enfermedad de distribución mundial producida por un platelminto parásito del género *Echinococcus*. El estado larval del cestodo desarrolla quistes en tejido hepático y pulmonar de ganado y humanos accidentalmente infectados. Las hidátides desarrolladas causan compresión a órganos circundantes, anafilaxis y muerte en pacientes. Se diagnostica mediante combinación de métodos de radioimagen e inmunoensayos, obteniéndose derivaciones no confiables. Así, se pretende desarrollar la técnica de Western Blot como método diagnóstico de la hidatidosis humana, utilizando fluido del metacestodo de *Echinococcus* sp., como análisis complementario a ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas- ELISA.

Primeramente mediante valoración morfométrica de ganchos rostelares de protoescolex presentes en la fracción sólida del fluido hidatídico de quistes arraigados al parénquima de tejido hepático porcino, se pudo identificar la especie *Echinococcus granulosus*, causante de la zoonosis parasitaria conocida como hidatidosis unilocular.

Mediante el análisis preliminar de cribado por la prueba ELISA Indirecto *casero* Proyecto 2-programa PROPAD se seleccionaron 40 muestras sanguíneas pertenecientes a la seroteca del mismo programa. Los sueros nuevamente se cribaron por la misma técnica y posteriormente fueron evaluadas por el Kit Comercial NovaTec NovaLisa Echinococcus IgG ELISA, obteniendo 31 sueros con reacción negativa y 9 muestras con reacción positiva para hidatidosis humana. La totalidad de las muestras sanguíneas fueron evaluadas por Western Blot de forma cualitativa, corroborando con las mismas derivaciones que las pruebas ELISA mencionadas, por lo cual la técnica obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100% siendo confiable para el diagnóstico.

Palabras clave: *Echinococcus*, identificación morfométrica, ELISA, Western Blot.

Abstract

Hydatidosis or echinococcosis is a disease of worldwide distribution produced by a parasitic flatworm of the genus *Echinococcus*. The larval stage of the cestode develops cysts in liver and lung tissue of cattle and humans accidentally infected. The developed hydatides cause compression to surrounding organs, anaphylaxis and death in patients. It is diagnosed by combining radioimage methods and immunoassays, obtaining unreliable leads. Thus, we intend to develop the Western Blot technique as a diagnostic method of human hydatidosis, using *Echinococcus* sp. Metacestodo fluid, as a complementary assay for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Firstly, by means of morphometric evaluation of protoescolex rostellar hooks present in the solid fraction of hydatid fluid of cysts rooted in the parenchyma of porcine liver tissue, it was possible to identify the species *Echinococcus granulosus*, the cause of the parasitic zoonosis known as unilocular hydatidosis.

By means of the preliminary screening analysis by the ELISA Indirect Home Project 2-program PROPAD, 40 blood samples belonging to the seroteca of the same program were selected. Again, the sera were screened by the same technique and later evaluated by the NovaTec NovaLisa Echinococcus IgG ELISA Commercial Kit, obtaining 31 sera with negative reaction and 9 samples with positive reaction for human hydatidosis. The totality of the blood samples were evaluated by Western Blot qualitatively, corroborating with the same derivations as the aforementioned ELISA tests, for which the technique obtained a sensitivity and specificity of 100% being reliable for the diagnosis.

Key words: *Echinococcus*, Morphometric identification, ELISA, Western Blot

Introducción

El género *Echinococcus* incluye endoparásitos del phylum Platyhelminthes, clase Cestodos, subclase Eucestodos, orden Cyclophyllidae, familia Tenuidae. Se reconocen cuatro especies en el género, denominadas *E. granulosus*, causante de la equinococosis quística, *E. multilocularis*, causante de la equinococosis alveolar, *E. vogeli* y *E. oligarthra*, causantes de la equinococosis poliquistica (Nakao, Lavikainen, Yanagida & Ito, 2013).

Echinococcus granulosus se encuentran en su estado adulto en el intestino de cánidos que actúan como hospederos definitivos y en su estado larval en hígado, pulmón y otros órganos de hospederos intermediarios (bovinos, ovinos, cerdos, équidos, caprinos y animales silvestres). El parásito infecta también al ser humano, de la misma forma que a un hospedero intermediario, al ingerir huevos que provienen de las heces del hospedero definitivo ya sea en vegetales, agua contaminada o por contacto directo con las heces de cánidos infectados (Álvarez, 2016).

La equinococosis o hidatidosis, es una ciclozoonosis que tiene distribución mundial, se encuentra relacionada con procedimientos sanitarios deficientes asociados generalmente a bajos niveles socio-económicos y a la ausencia o incompleta educación sanitaria (Sánchez, Cáceres & Náquira, 2004). En Suramérica la infección presenta una elevada incidencia en Argentina, Uruguay, Chile, Brasil y Perú, en el periodo entre enero 2009 a diciembre 2014 los cinco países mencionados reportaron un total de 29 556 casos positivos a hidatidosis en humanos, lo que conlleva a un problema en salud pública (PANAFTOSA, 2015). En Ecuador, esta parasitosis se encuentra distribuida con una baja prevalencia comparada con países vecinos, reportando 109 casos entre los años 2007 a 2014 (Berger, 2017) y 30 casos entre los años 2014 a 2016, de los

cuales 13 fueron registrados en casas de salud de las provincias de Guayas y Pichincha (INEC, 2016).

En Chile la carga económica que produce los pacientes positivos, por el consumo de medicamentos, estadía hospitalaria e insumos, genera 1 293 USD/diarios de gasto para el sistema de salud (Fica & Weitzel, 2014), en Ecuador se estima un gasto similar. Por ello el diagnóstico oportuno y preciso de la equinococosis sería de gran ayuda ya que los quistes hidatídicos, se caracterizan por no dar manifestaciones clínicas hasta que hayan alcanzado el suficiente tamaño para provocar complicaciones por la compresión en órganos circundantes (Vizcaychipi, Sosa, Camicia, Santillán, Casalins & Nigro, 2012). Así mismo, la infección de pacientes positivos generalmente ocurre en la infancia y la sintomatología se manifiesta en edades adultas pudiendo el parásito larvar por mucho tiempo en diferentes tejidos: hepático y pulmonar principalmente, presentándose también en corazón, cerebro y riñones (Sánchez, Náquira, Vega, Miranda, Quispe & Ayala, 2010).

El diagnóstico oportuno y vigilancia de esta parasitosis ha demostrado su eficacia en países desarrollados, lo que no ha sucedido en países en desarrollo como el Ecuador. Técnicas de radioimagen como ultrasonido, radiología, tomografía o resonancia magnética nuclear, se utilizan para determinar la presencia de hidátides en tejidos, pero actualmente las pruebas inmunológicas conforman procesos muy acertados. La técnica ELISA presenta una sensibilidad del 98.9% y una especificidad de 88%, lo cual genera la presencia de falsos positivos y además presenta reacciones cruzadas con otros helmintos. Western Blot se usa como método complementario por tener 91.30% de sensibilidad y 95.4% de especificidad (Moral, 2012).

Por estas razones, con el presente trabajo se pretende desarrollar la técnica de Western Blot como método diagnóstico de la hidatidosis humana, utilizando fluido del metacestodo de *Echinococcus* sp., como análisis complementario a otras pruebas serológicas de cribado, en este caso ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas-ELISA. Para cumplir el objetivo de la investigación se deberán evaluar extractos proteicos recogidos del fluido hidatídico de quistes hepáticos de ganado faenado en la Empresa Pública Metropolitana de Rastro, identificar de forma morfométrica la especie parasitaria causante de dichas anomalías, seleccionar por ELISA Indirecto muestras sanguíneas con reacción positiva y negativa de la seroteca del Programa Nacional para el Abordaje Multidisciplinario de las Parasitosis Desatendidas en el Ecuador-PROPAD y, valorar los sueros seleccionados por la técnica Western Blot.

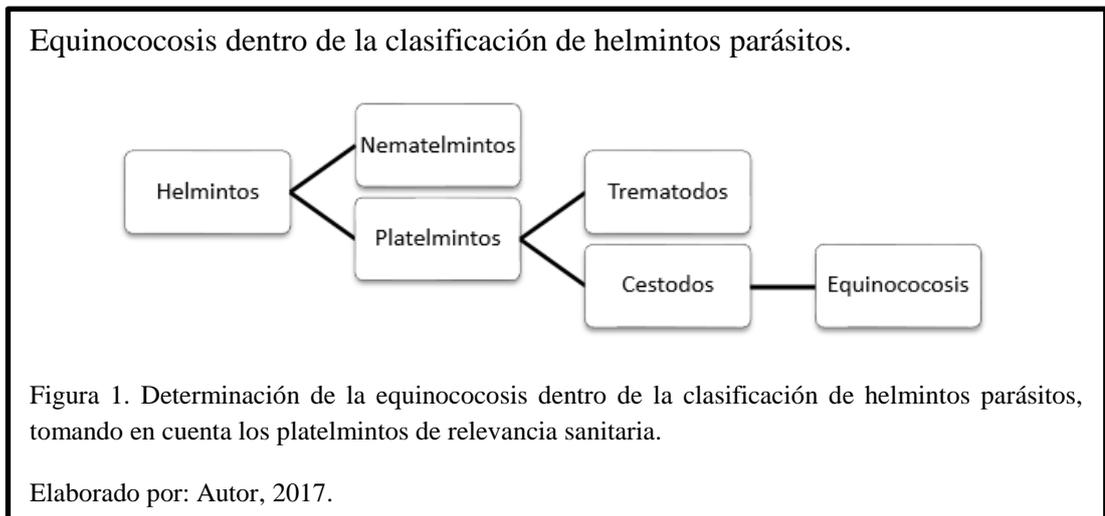
Para ello se establece como hipótesis alternativa que al menos una de las muestras de suero sanguíneo seleccionadas y evaluadas por la prueba ELISA coincida a los resultados por Western Blot.

Capítulo 1

Marco conceptual

1.1 Helmintos

Son animales invertebrados de cuerpo alargado y simetría bilateral. Conforman organismos de vida libre así como endoparásitos, que generalmente se alojan en órganos internos (especialmente hígado, intestino, estómago, pulmones) de diversos tipos de animales, tanto vertebrados, como invertebrados (Silva, 2014). Como se detalla en la Figura 1, se clasifican en nematelmintos o gusanos redondos, y platelmintos o gusanos planos



Los helmintos parásitos provocan infecciones que dañan el órgano afectado, además desarrolla competencia por diversos nutrientes con sus hospedadores induciendo deficiencias en el desarrollo de los animales que parasitan y en casos extremos la muerte. Principalmente las infecciones por helmintos afectan al ganado, produciendo graves pérdidas económicas a nivel mundial y pueden afectar directamente al hombre, causando graves afecciones. La Organización Mundial de la Salud estima que 1500 millones de personas, casi el 24 % de la población mundial, son parasitados por helmintos transmitidos por el suelo. Este tipo de infecciones se distribuyen en zonas

tropicales y subtropicales, especialmente en las zonas de África subsahariana, América y Asia (OMS, 2017).

1.1.1 Platelminetos

Son gusanos aplanados dorsoventralmente, acelomados, es decir que presentan una cavidad maciza recubierta de un tegumento. Dependiendo la clase, pueden contener un sistema digestivo incompleto, o carecer del mismo absorbiendo los nutrientes a través del tegumento. Dado que no poseen aparato circulatorio, el fluido intercelular es el encargado de distribuir los nutrientes y recoger los productos de desecho. La mayoría de estos organismos son hermafroditas, que en algunos estadios también puede desarrollar partenogénesis (Brusca & Brusca, 2003). Dentro del phylum se incluyen organismos de vida libre, como las planarias (turbelarios) y organismos parásitos (monogéneos, trematodos y cestodos). En particular, los monogéneos son parásitos de peces y anfibios, mientras que los trematodos y los cestodos son parásitos de relevancia sanitaria, ya que afectan a diversos animales domésticos y al hombre (Littlewood, 2006).

1.1.1.1 Cestodos

Son platelmintos de cuerpo alargado con forma de cinta, acelomados cubiertos por un tegumento especializado por donde ocurre el intercambio de los nutrientes y la eliminación de los desechos (Silva, 2014). Para completar sus ciclos de vida requieren de uno o dos hospedadores distintos, donde siempre el estadio adulto se encuentra parasitando el tracto digestivo de hospedadores definitivos, usualmente vertebrados. Por el contrario, los estadios larvarios son capaces de establecerse en diversos órganos de sus hospedadores intermediarios (Littlewood, 2006).

Los cestodos adultos morfológicamente presentan, el escólex o cabeza, el cuello y el estróbilo o cuerpo del parásito. En el escólex se encuentran los órganos de fijación a los tejidos del hospedador, tales como el rostelo, las ventosas y los ganchos. El cuello es una región no segmentada de la cual se generan las proglótides que conforman el estróbilo. En estas proglótides se encuentran los órganos sexuales masculinos y femeninos. La madurez sexual se va alcanzando a medida que las proglótides se alejan del cuello, siendo las últimas las que se encuentran grávidas conteniendo huevos (Silva, 2014). Las principales infecciones causadas por cestodos son: Teniasis/Cisticercosis, Himenolepiasis, Difilobotriosis y Equinococosis (OMS, 2017).

1.2 *Echinococcus granulosus*

Parásitos cestodos ténidos ciclozoonóticos potencialmente mortales, que en su estadio larval o metacestodo causan la equinococosis unilocular o quística, parasitosis grave con una característica lesión semiesférica llena de líquido (Nakao *et al*, 2013).

En el trabajo se pondrá énfasis en detallar a la especie *E. granulosus* porque su forma larvaria o metacestodo causa la enfermedad conocida como equinococosis quística o hidatidosis, antropozoonosis de interés endémica en la región (PANAFTOSA, 2015).

1.2.1 Taxonomía

Pertenecen al reino Animalia, dominio Eukarya, filo Platyhelminthes, clase Cestoda, subclase Eucestoda, orden Cyclophyllidea, familia Taeniidae y género *Echinococcus*. Dicho genero comprende 10 especies (Tabla 1) con genotipos diferentes, las cuales se describían erróneamente como cepas de *E. granulosus* (Hernández, 2012; Nakao *et al.*, 2013; Silva, 2014).

Tabla 1.**Descripción de las especies del género *Echinococcus*.**

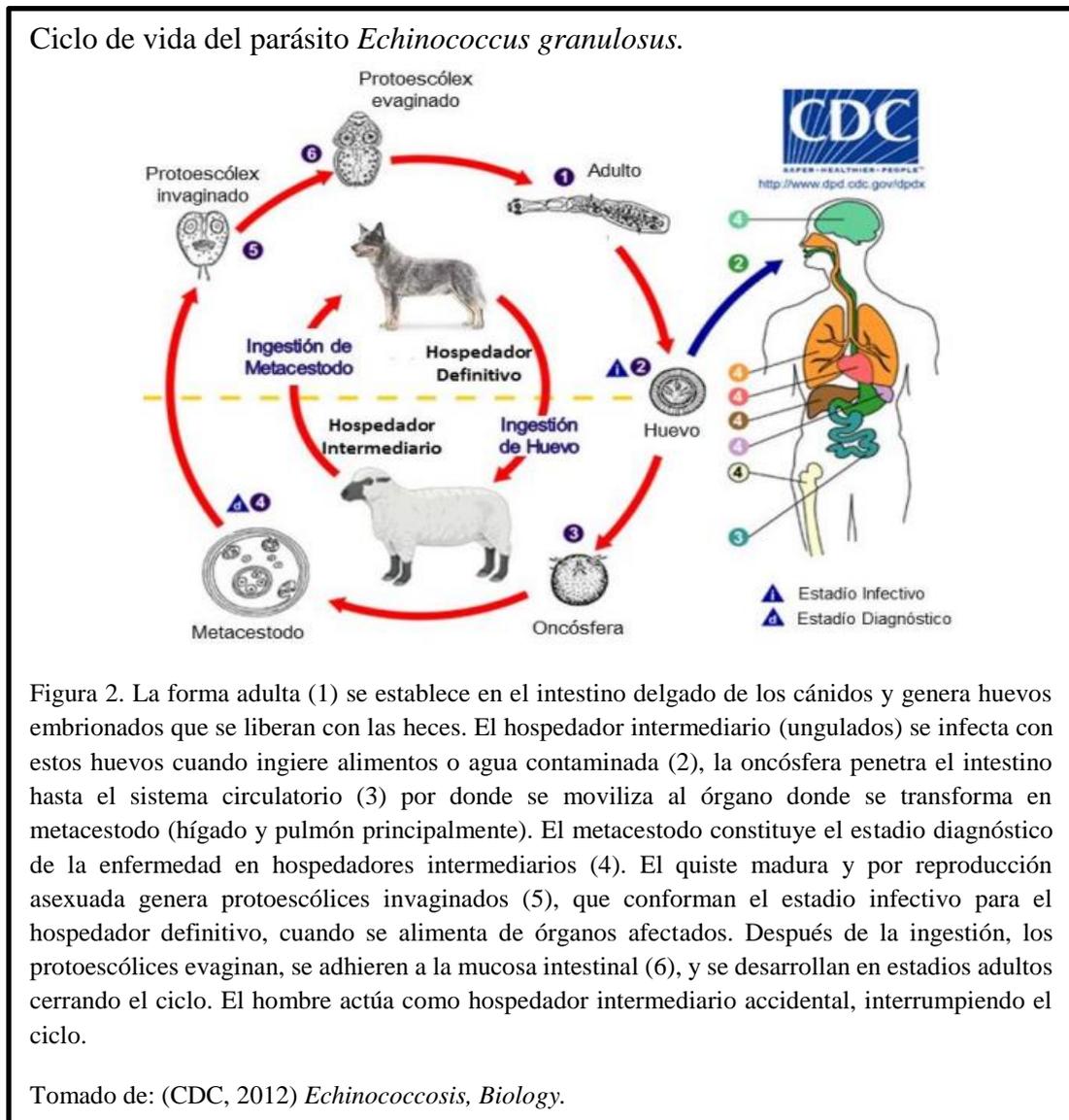
Especie	Distribución geográfica	Huésped definitivo	Huésped Intermediario	Características Hidátide	Casos Humanos
<i>Echinococcus granulosus</i> sensu stricto	Todo el mundo	Cánidos	Ungulados, también marsupiales y primates, humanos	Unilocular	Común
<i>Echinococcus felidis</i>	África	Leones	Desconocido	Desconocido	Desconocido
<i>Echinococcus Multilocularis</i>	Eurasia y Norte América	Zorros, cánidos y felinos.	Roedores, otros pequeños mamíferos, humanos	Alveolar	Común
<i>Echinococcus shiquicus</i>	Meseta tibetana	Zorros tibetanos	Picas	Unilocular	Desconocido
<i>Echinococcus equinus</i>	Europa, Oriente Medio y África	Perros	Caballos	Unilocular	Desconocido
<i>Echinococcus oligarthra</i>	América del Sur y Central	Felinos salvajes	Roedores humanos y	Poliquística	Raro
<i>Echinococcus vogeli</i>	América del Sur y Central	Perro de monte	Roedores humanos y	Poliquística	Raro
<i>Echinococcus orteppi</i>	Europa, África, India, Nepal, Rusia	Perros	Ungulados humanos y	Unilocular	Raro
<i>Echinococcus canadensis</i> G6/G7	Todo el mundo	Perros	Ungulados humanos y	Unilocular	Raro
<i>Echinococcus canadensis</i> G8	Ártico del norte y boreal	Lobos	Alces y ciervos. Humanos	Unilocular	Raro
<i>Echinococcus canadensis</i> G10	Ártico del norte y boreal	Perros y lobos	Alces, renos y ciervos. Humanos	Unilocular	Raro

Nota: Nakao *et al.*, 2013 (Modificado por el Autor).

1.2.2 Ciclo biológico

El ciclo de transmisión es indirecto donde un carnívoro, habitualmente el perro y zorro, actúa como hospedador definitivo, mientras que diferentes animales omnívoros o herbívoros (Hernández, 2012; Silva, 2014), incluyendo al hombre que se conforman como hospedadores intermediarios a través de la ingestión de agua o de alimentos contaminados con los huevos del parásito, o por el contacto estrecho con perros parasitados. En este sentido, la niñez es la etapa de la vida donde generalmente se

produce la infección (Moral, 2012). En la Figura 2 se muestra un esquema del ciclo de vida de *E. granulosus*.



Las otras especies de *Echinococcus* presentan ciclos de vida similares, en el caso de *E. multilocularis*, causante de la equinococosis alveolar, el hospedador definitivo suele ser el zorro mientras que la larva se desarrolla en distintos tipos de roedores y de forma menos común el hombre. Los parásitos *E. vogeli* y *E. oligarthra*, que provocan distintos tipos de equinococosis poliquística, suelen emplear roedores como hospedadores intermediarios, mientras que el hospedador definitivo es el perro de

monte (*Speothos venaticus*) en el caso de *E. vogeli* y felinos salvajes en *E. oligarthra*. Sin embargo, si bien estos parásitos también pueden afectar al hombre, lo hacen en mucha menor medida que *E. granulosus* (Silva, 2014).

En Ecuador, generalmente el ciclo biológico que establece el parásito es perro-cerdo-perro, además en la sierra se observa el ciclo perro-oveja-perro (Estévez, 2016).

1.2.3 Morfología

1.2.3.1 Adulto

Los adultos maduros miden de 2 a 6 mm de longitud, se encuentran constituidos de: la cabeza o escólex con cuatro ventosas y un rostelo, con una doble corona de ganchos para la fijación intestinal, el cuello que es una región estrecha que une el escólex con el estróbilo del parásito. El estróbilo está formado por tres proglótides distintas que se diferencian de acuerdo a su madurez sexual, siendo la más cercana al cuello la más inmadura (Silva, 2014). En el anexo 1a se muestra el esquema de un individuo adulto.

La reproducción sexual ocurre por auto-inseminación, en la que el órgano sexual masculino, denominado cirro, se introduce en la vagina de una misma proglótide, así se generan los huevos que se conservan en el útero grávido. Esta proglótide grávida es finalmente liberada junto con las heces del hospedador definitivo para liberar los huevos al ambiente (Hernández, 2012; Silva, 2014).

1.2.3.2 Huevo

Los huevos de *E. granulosus* presentan forma casi esférica, con aproximadamente 30 μm de diámetro. Poseen una gruesa capa externa formada por bloques de queratina, denominada embrióforo, que protege al embrión u oncósfera. Gracias a esta capa los huevos son sumamente resistentes a las condiciones climáticas adversas; tanto que son

capaces de sobrevivir bajo tierra durante años (Silva, 2014) a temperaturas que oscilan entre -30 a 30 °C (Hernández, 2012). En el Anexo 1b se observa la estructura.

La eclosión del huevo ocurre cuando este es ingerido por el hospedador intermediario, primero por acción de los jugos gástricos ocurre la desintegración del embrióforo, después la oncósfera libre se activa por acción de la bilis y esta penetra las vellosidades intestinales llegando al sistema circulatorio por donde se moviliza hasta el hígado y pulmones principalmente, para implantarse y seguir con su desarrollo hacia el estadio larval (Hernández, 2012; Silva, 2014).

1.2.3.3 Larva, metacestodo o quiste hidatídico

El metacestodo es un quiste unilocular, de forma ovoidea y relleno de un fluido claro denominado líquido hidatídico. Se encuentra recubierto por tres revestimientos: exteriormente la capa adventicia conformada por fibroblastos, tejido conectivo y las células parenquimatosas del tejido huésped infectado donde se observan canales vasculares propios del tejido que permiten la nutrición de la larva (Golzari & Sokouti, 2014), al medio una matriz acelular denominada capa laminar constituida por mucinas especializada en permeabilizar nutrientes y adaptarse al tejido extraño evitando el ataque inmunológico y la inflamación local inherente (Díaz, Casaravilla, Irigoín, Lin, Previato & Ferreira, 2011; Díaz, Fernández, Pittini, Seoane, Allen & Casaravilla, 2015), por último la capa germinativa constituida por células tegumentarias y células indiferenciadas que por gemación generan vesículas prolíferas internamente, en las que se generan los protoescólices, que constituirán el estadio infectivo para el hospedador definitivo. En algunos casos, la hidátide puede contener dentro quistes hijos que presentan el mismo tipo de estructura (Silva, 2014). En la Figura 3 se muestran estas estructuras.

Morfología de un quiste hidatídico de *E. granulosus*

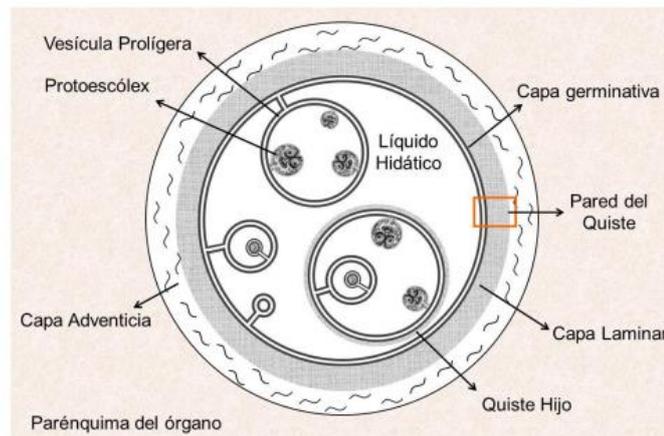


Figura 3. Esquema morfológico de un quiste hidatídico de *E. granulosus*, el cual se encuentra arraigado al parénquima del órgano infectado en el hospedero intermediario.

Tomado de: (Silva, 2014) *Caracterización estructural y funcional del Antígeno B de Echinococcus granulosus*.

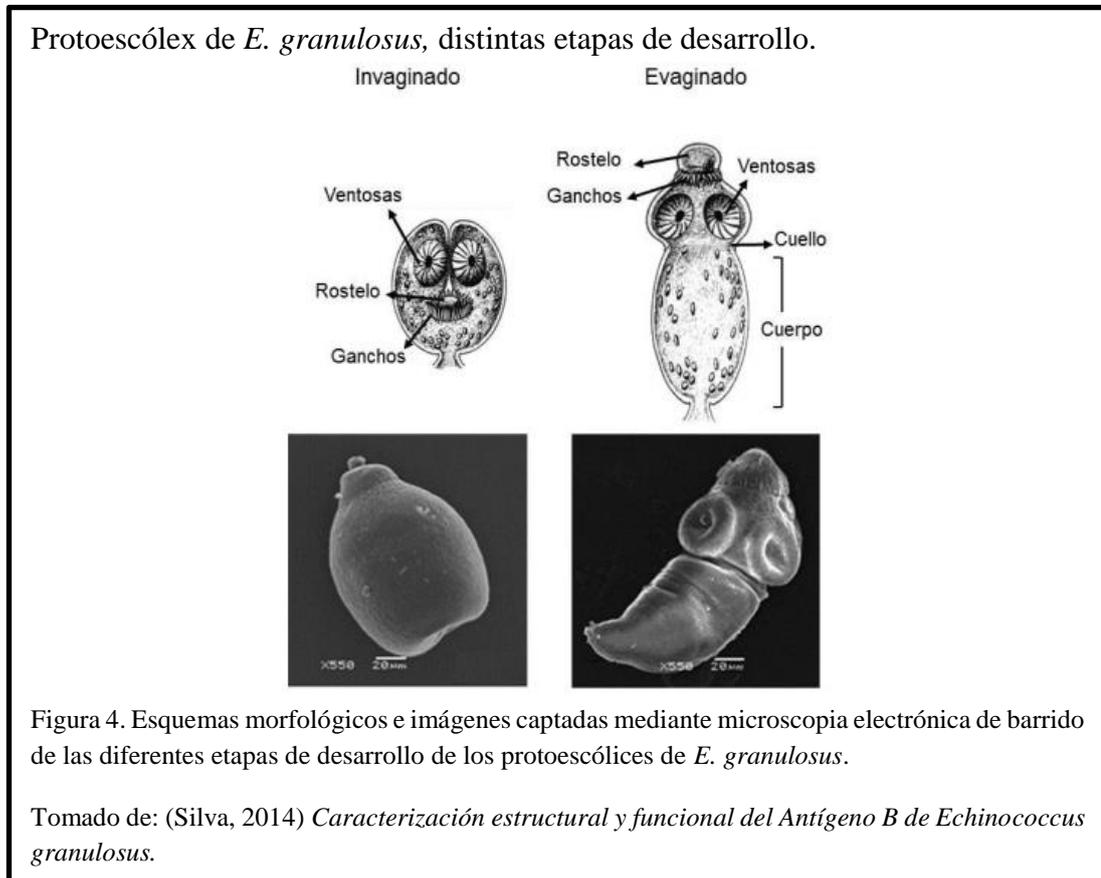
Tanto los protoescolices como la pared del quiste, compuesta por la capa germinativa y laminar, generan diversos productos de excreción/secreción que son vertidos al fluido que se encuentra en el interior del quiste, el líquido hidatídico (Silva, 2014).

El líquido hidatídico está formado por una mezcla compleja de glicoproteínas, lipoproteínas, hidratos de carbono y sales minerales. Debido a la permeabilidad de la capa laminar también se encuentran componentes del hospedador, principalmente seroalbúmina (Aziz, Zhang, Li, Loukas, McManus & Mulvenna, 2011).

1.2.3.4 Protoescoléx

Los protoescolices surgen del metacestodo, específicamente de las vesículas prolíferas, mediante gemación asincrónica entre los 10 y 16 meses luego de la infección. Presentan un rostelo con una doble corona de ganchos y cuatro ventosas que normalmente se encuentran invaginados, pudiéndose también desarrollar hasta evaginarse. Su cuerpo está recubierto por un tegumento similar al del parásito adulto la capa germinativa del quiste. Por lo general, durante su formación quedan unidos a

la membrana germinal a través de un pedúnculo y se separan una vez que se encuentran totalmente desarrollados, quedando suspendidos en el líquido hidatídico (Hernández, 2012; Silva, 2014). En la Figura 4 se ilustran estas estructuras.



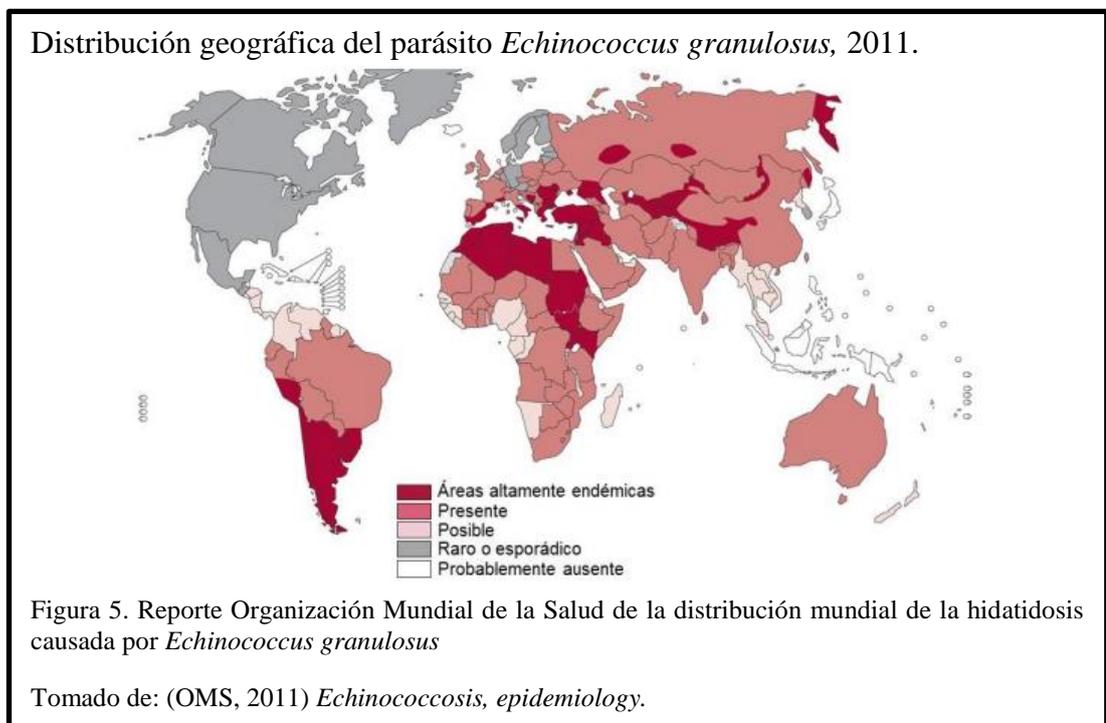
Los protoescólices presentan gran plasticidad en su desarrollo; pudiendo tender en dirección estrobilar, dando lugar al estadio adulto en el hospedador definitivo o en dirección vesicular generando nuevos metacestodos en el hospedador intermediario. Este tipo de infección secundaria, ocurre si los protoescólices son liberados por ruptura del quiste e infectan a otros órganos (Silva, 2014).

1.2.4 Epidemiología

La equinococosis quística o unilocular se distribuye a nivel mundial en áreas de producción ganadera, frecuentemente asociadas a determinantes sociales tales como comunidades pobres, alta ruralidad, pueblos originarios, y economías de subsistencia

concentrándose en áreas altamente endémicas en la parte oriental de la región mediterránea, el norte de África, el sur y este de Europa, al sur de Sudamérica, Asia Central y Siberia (OMS, 2011), como se visualiza en la figura 5.

La mayor prevalencia de hidatidosis unilocular se encuentra en zonas rurales de China, África oriental, Argentina y Perú, donde del 5 al 10% de la población presenta la enfermedad. La hidatidosis alveolar está restringida al hemisferio norte, en particular a las regiones de China, Rusia, Europa continental y América del Norte (OMS, 2011).



Según el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA, 2015) en el periodo Enero 2009-Diciembre 2014, los países que constituyen la “Iniciativa para el control de la equinocosis quística: Argentina, Brasil, Chile, Perú y Uruguay” reportaron 29.556 casos humanos, siendo Perú el país con el mayor número de enfermos con 20.785 casos. Además, menciona que existe una considerable subnotificación de los casos de hidatidosis en los registros oficiales de los países de la región.

En Ecuador, esta parasitosis se encuentra distribuida con una baja prevalencia comparada con países vecinos, reportando 109 casos entre los años 2007 a 2014 (Berger, 2017) y 30 casos entre los años 2014 a 2016, de los cuales 13 fueron registrados en casas de salud de las provincias de Guayas y Pichincha (INEC, 2016).

Es importante mencionar que el ganado para alimentación en diferentes zonas del país ha evidenciado la presencia de la enfermedad, Estévez (2016) aporta su estudio realizado en la Empresa Metropolitana de Rastro Quito con una evidencia del 1.15% de cerdos positivos para hidatidosis, en el Centro de Faenamiento Municipal de Guayaquil, Lucena (2006) registró que el 1.13% fueron positivos y Tisalema (2007) evidenció quistes hepáticos 3.46% en los porcinos muestreados en el Centro de Faenamiento de la ciudad de Riobamba.

1.2.5 Características clínicas

Los pacientes permanecen asintomáticos hasta que el efecto de la expansión de los quistes en el órgano afectado origina síntomas, generalmente la infección se da en la infancia y la sintomatología se manifiesta en la edad adulta. Los quistes se localizan en hígado y pulmones, pero pueden presentarse también en bazo, riñones, corazón, huesos, sistema nervioso central y ojos (Sánchez *et al.*, 2010).

Las manifestaciones clínicas dependen del lugar de desarrollo de los quistes; en el hígado provocan hepatomegalia, dolor abdominal, ictericia, fiebre, prurito, urticaria y eosinofilia; en pulmones ocasionan tos, dolor torácico y hemoptisis; en huesos invaden la cavidad medular provocando erosiones óseas y fracturas patológicas; en el sistema nervioso central producen cefalea y convulsiones; y en corazón originan defectos de conducción y pericarditis. Además, la ruptura de un quiste puede producir anafilaxis y muerte del afectado (Silva, 2014; Ruano, Félix, Tarupi, Herrera & Gutiérrez, 2015).

1.2.6 Diagnóstico

El diagnóstico de la hidatidosis se basa en manifestaciones clínicas, métodos de imagen, datos epidemiológicos y técnicas serológicas. La diagnosis de certeza solo puede hacerse por la visualización macroscópica del quiste en el acto quirúrgico o de estructuras parasitarias observadas microscópicamente. El diagnóstico de riesgo se establece por una combinación de métodos de imagen como; ultrasonido, tomografía computarizada, radiografía, resonancia magnética, e inmunodiagnóstico serológico y técnicas histológicas. Tales procedimientos no han llegado a ser implementados como pruebas rutinarias en clínica y muestran resultados confusos para la diagnosis y seguimiento en post-tratamientos (Hernández, 2012; Hassanain, Shaapan & Khalil, 2014; Ruano *et al.*, 2015).

1.2.6.1 Técnicas imagen

La ultrasonografía es la técnica de imagen más utilizada debido a su gran utilidad al definir número, localización, tamaño y viabilidad de los quistes hidatídicos en el hígado y cavidad abdominal. Es bien tolerada por la población, siendo capaz de detectar quistes en etapas relativamente tempranas, hace posible la identificación del tipo de quiste y conlleva un bajo costo. Sin embargo, presenta desventajas, como su inaplicabilidad para la detección de quistes en otras localizaciones distintas al hígado y abdomen. También como se muestra en la figura 6, el diagnóstico diferencial con otras lesiones similares en imagen a hidátides es complicado. Por último, dependen de un tamaño mínimo de los quistes para ser detectados y los equipos no están disponibles en la práctica clínica de muchas zonas endémicas (Hernández, 2012). Por todos estos inconvenientes, la OMS recomienda el uso de una segunda prueba diagnóstica, por ejemplo una basada en la detección de anticuerpos o antígenos específicos

Distintas lesiones hepáticas detectadas por ultrasonografía con un aspecto similar a un quiste hidatídico.

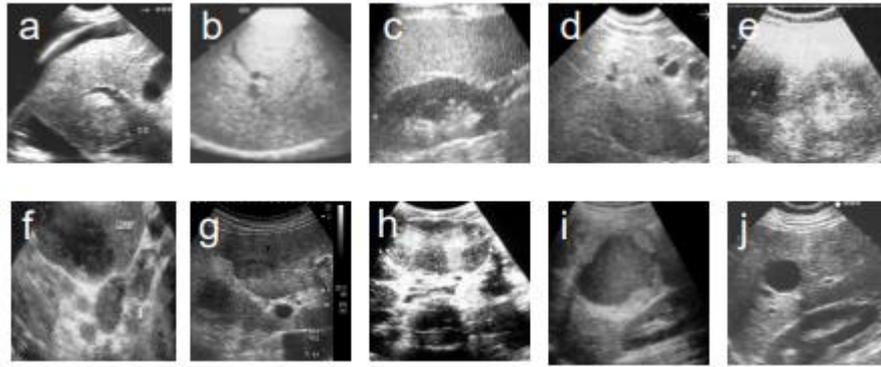


Figura 6. a, Cirrosis; b, Hepatitis; c, Esteatosis; d, Poliquistosis; e, Hematomas; f, Absceso amebiano; g, Neoplasia; h, Hiperplasia nodular focal; i, Adenoma; j, Quistes congénitos.

Tomado de: (Hernández, 2012) *Validación de un nuevo antígeno recombinante para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con hidatidosis, y su aplicación a un test comercial.*

1.2.6.2 Inmunodiagnóstico

Las pruebas serológicas son utilizadas para evaluar pacientes con anomalías sugerentes de quiste hidatídico, seguimiento de pacientes post-tratamiento y para estudios epidemiológicos de zonas en riesgo. Requieren de la reacción antígeno/anticuerpo, lo que demanda la capacidad de respuesta inmunológica del huésped y el contacto de este sistema inmunocompetente con los antígenos de la capa germinativa (Moral, 2012; Fotoohi, Hashemi & Borji, 2013). Se lleva a cabo por técnicas como Hemaglutinación Indirecta (HAI), Enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA), Inmunofluorescencia (IFI), Inmunoblot e Inmunoprecipitación.

El ELISA, por su sensibilidad, se recomienda como técnica de elección para el diagnóstico y seguimiento, quedando el InmunoBlot como test confirmatorio, por ser más específica (Flores & Rodríguez, 2006; Moral, 2012).

Ambas técnicas están constituidas por 4 componentes principales; el antígeno obtenido en este caso como extracto parasitario del estadio larval, anticuerpos como las inmunoglobulinas séricas que en el organismo reconocen sustancias foráneas para

desencadenar las reacciones inmunológicas, un anti-anticuerpo marcado con una enzima que se liga a los anteriores y un substrato que reacciona con la enzima.

El metacestodo secreta fuera de sus membranas, antígenos que provocan la respuesta inmunológica en el hospedero. Según Aziz, *et al.* (2011) y Li, *et al.* (2013) el fluido del quiste hidatídico (HCF), recolectado de animales infectados, es una mezcla compleja de una amplia gama de compuestos tanto de origen parasitario como de huésped, además describen como la fuente principal de AgB y Ag5, antígenos de *E. granulosus*, que se utilizan para el diagnóstico serológico. Por otra parte, las mismas proteínas antigénicas son producidas específicamente por el tegumento de los protoescólices y estadio adulto del parásito, y sintetizado por la capa germinativa de la pared del quiste hidatídico, pero presentan dificultad de estandarización por variabilidad de componentes y reactividad cruzada con otros parásitos (Silva, 2014).

El Ag5 es un complejo lipoproteico de alto peso molecular, que en condiciones reductoras se disocia en subunidades de 38 y 22-24 kDa (Lorenzo, Last & González, 2005; Pagnozzi, Biosa, Addis, Mastrandrea, Masala & Uzzau, 2014). AgB es una lipoproteína termoestable que se disocia, tanto en condiciones reductoras como no reductoras, en subunidades de 8, 16, 24 y 32 kDa (Hernández, 2012; Obal, Ramos, Silva, Lima, Batthyany, Bessio, Ferreira, Salinas, & Ferreira, 2012; Silva, 2014).

Hernández (2012) y Silva (2014) mencionan que la detección de IgG da lugar a tests más sensibles, por ser la inmunoglobulina más abundante, seguida por la IgM y la IgE. Además, coinciden en que la detección de IgM, IgE e IgA es útil en el seguimiento de pacientes en los que estos isotipos disminuirían gradualmente tras la curación.

El conjugado o anti-anticuerpo marcado con una enzima, debe unirse fácilmente a antígenos y anticuerpos, encontrarse en estado puro y tener un substrato conveniente

y de fácil preparación. (Cultek, 2006). Las enzimas más utilizadas son; fosfatasa alcalina que necesita tampones específicos para reaccionar y peroxidasa de rábano ideal por su costo, estabilidad y la variedad de sustratos con los que puede reaccionar.

Para la elección del sustrato se toma en cuenta, la sensibilidad, especificidad, repetibilidad, facilidad de lectura, complejidad de preparación y estabilidad después de parar la reacción. Cultek (2006) describe tres métodos de detección: colorimétricos, que dan un producto de reacción coloreado, siendo la densidad óptica del mismo proporcional a la cantidad de producto medido; fluorescentes, donde la enzima convierte el sustrato en un producto que emite fluorescencia cuando es excitado a una determinada longitud de onda, siendo los fotones de luz proporcionales a la cantidad de producto analizado; y luminiscentes, que las unidades relativas de luz generadas son proporcionales a la cantidad de muestra presente. En la figura 7, se detallan algunos sustratos para las enzimas antes mencionadas.

Enzimas y sustratos utilizados en enzimoanálisis.	
Fosfatasa alcalina	
Producto insoluble	<ul style="list-style-type: none"> 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/cloruro de nitroazul tetrazolio (BCIP/NBT)
Producto soluble	<ul style="list-style-type: none"> p-Nitrofenilfosfato (p-NPP): Amarillo $\lambda=405-410$ nm 4-Metilumbelliferil fosfato (4-MUP): fluorescente (3-(2'-spiroadamantane)-4-metil-4-(3'-fosfryloxyphenil-1, dioxetao, disodio sal)) (AMPPD): Luminiscente
Peroxidasa de rábano	
Producto insoluble	<ul style="list-style-type: none"> 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB): Azul $\lambda=650$ nm, Amarillo $\lambda=450$ nm 3,3-Diaminobencidina (DAB) 4-cloro-1-naftol (4CN)
Producto soluble	<ul style="list-style-type: none"> TMB: Azul $\lambda=650$ nm, Amarillo $\lambda=450$ nm Acido-2,2-acino-di-(3-etil)benzotiazolona-6-sulfónico (ABTS): Azul verdoso $\lambda=405-410$ nm o-fenilendiamina (OPD): Amarillo $\lambda=450$ nm 3-(p-hidroxifenilo) (HPPA): Fluorescente Luminar: Quimioluminiscente Polifenoles: Quimioluminiscente Esteres de acridina: Quimioluminiscente Luciferina: Bioluminiscente

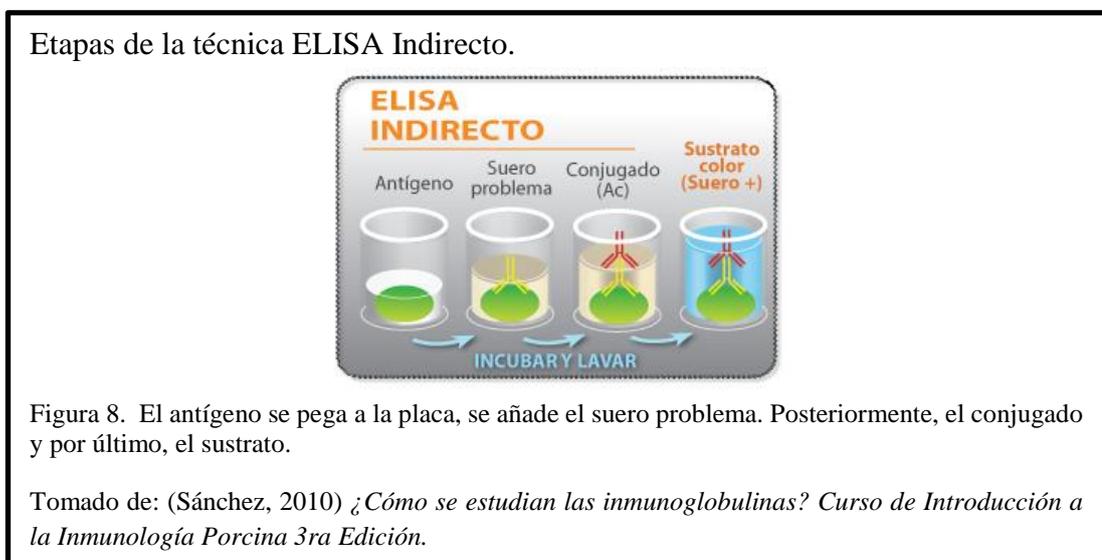
Figura 7. Ejemplos de sustratos solubles (ELISA) e insolubles (ImmunoBlot) para enzimas fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano utilizadas en enzimoanálisis.

Elaborado por: Autor, 2017.

1.2.6.2.1 Técnica ELISA indirecto

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utiliza una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Esta metodología se basa en: 1) El antígeno y anticuerpo deben enlazarse a una superficie portadora insoluble y retener su reactividad inmunológica; 2) las enzimas tienen actividad específica alta y convierten una cantidad relativamente grande de sustrato en producto detectable, lo que permite detectar concentraciones muy bajas del ligando; 3) la actividad enzimática o reactividad inmunológica de los conjugados se preserva y permanece estable durante el análisis y el almacenamiento; y 4) las enzimas no están presentes en el líquido biológico que se va a analizar (Vázquez, 2004).

Según el componente marcado existe dos grupos de pruebas; cuando el antígeno se hibrida con la enzima se conoce como ELISA competitivo, y si el anticuerpo secundario está unido a la enzima se hace referencia a que no es competitivo, en este último encontramos: ELISA Directo, Indirecto, Sándwich Doble y Heterólogo. El ELISA Indirecto, de interés en este trabajo, es el método más utilizado para la determinación de anticuerpos y consta de 5 etapas, como se observa en la figura 8.



La mayoría de kits comerciales para uso diagnóstico utilizan este tipo de ELISA por su facilidad. Entregan los antígenos, proteínas virales o bacterianas e incluso virus completos insolubilizados previamente sobre la placa, listos para la adición de los elementos siguientes (Cultek, 2006; NovaTec, 2009; Sánchez, 2010).

1.2.6.2.2 Western Blot o ImmunoBlot

La inmunoelectrotransferencia ligada a enzimas (EITB) o Immunoblot, es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra compleja determinada. Consta de tres fases; en la primera se separan los extractos proteicos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, de esta manera los antígenos son separados en bandas según el criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc. En una segunda fase denominada transferencia se movilizan las proteínas que han quedado separadas en el gel a una membrana adsorbente, típicamente de nitrocelulosa o de polivinildifluoruro (PVDF). En la tercera fase se corta la membrana anterior en tiras y se incuban con los sueros en estudio, posteriormente se incuban las tiras con un anti-anticuerpo marcado con una enzima que permitirá detectar los anticuerpos que se han unido a las proteínas presentes en las tiras, al reaccionar colorimétrica, fluorescente o luminiscentemente con un substrato (BioRad, 2016).

La electroforesis en geles de poliacrilamida o PAGE, hace referencia a la separación de proteínas en conglomerados de oligopéptidos por acción de un campo eléctrico, de esta manera las moléculas fragmentadas se movilizan hacia el electrodo con carga opuesta, donde la velocidad de migración dependerá de: la carga neta, tamaño y forma de la molécula, fuerza del campo eléctrico, fuerza iónica, viscosidad y temperatura. Para este procedimiento se utiliza un sistema de buffers discontinuo formado por dos

geles distintos polimerizados entre láminas de vidrio. En la parte superior se coloca un gel concentrador con un tamaño de poro mayor que sirve para concentrar las muestras antes de que ingresen al gel inferior o separador (UNQ, 2008).

BioRad (2016) menciona dos tipos de procedimientos: el PAGE-Nativo donde las proteínas no se someten a desnaturalización o reducción migran íntegramente en función de su carga, tamaño y forma, y el PAGE-Reductor donde en presencia de un detergente aniónico, como el sodio dodecilsulfato (SDS-PAGE), las proteínas migran después de haberlas desnaturalizado por aumento de temperatura y reducido, ruptura puentes disulfuro, con B-mercaptoetanol o ditioneitol. Las moléculas de detergente se unen a razón de un SDS por cada dos aminoácidos lo que otorga una carga negativa a la masa de la proteína, por lo cual en la movilización las proteínas de menor tamaño se resuelven en la parte inferior del gel, y las de mayor tamaño van quedando retrasadas al atravesar la malla del gel, observándose en la parte superior. La cualificación de los resultados se evidencia con colorantes, principalmente Azul de Coomassie.

El SDS-PAGE es el método idóneo para el inmunoblot, por la presentación en bandas identificables de los componentes de una mezcla proteica, en este caso extractos antigénicos parasitarios. La identificación con Azul de Coomassie se omite, ya que este colorante se une de forma covalente a los radicales libres de los oligopéptidos separados en el PAGE lo cual anularía la inmunodetección (Yábar, 2003).

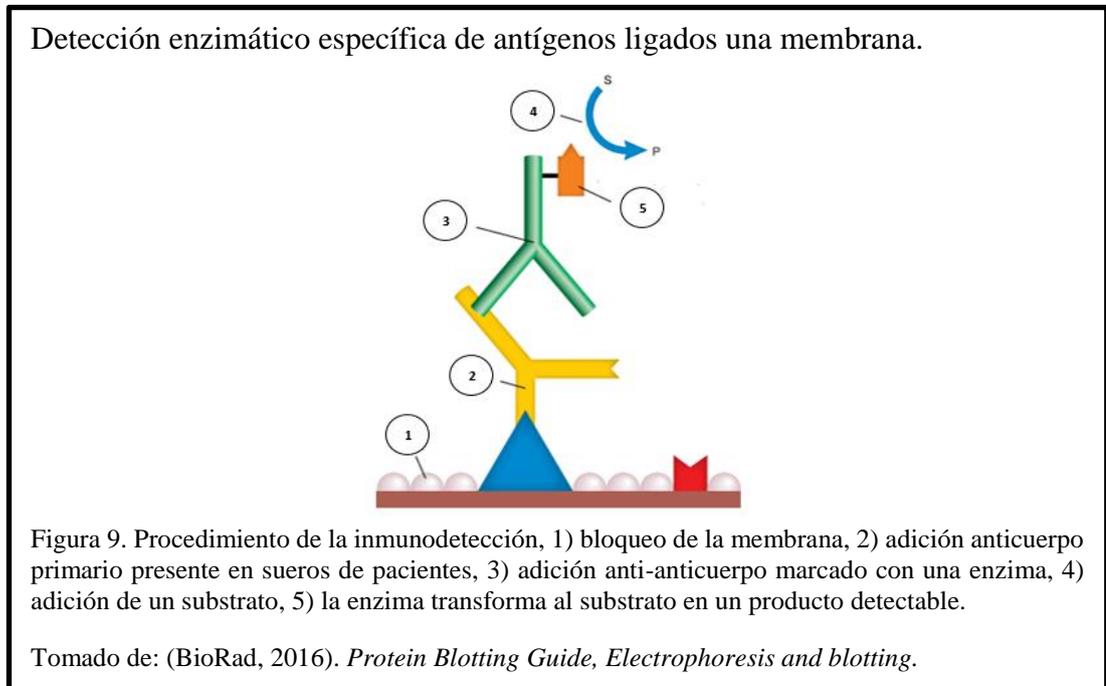
Continuando, la transferencia es el paso que permite que las proteínas sean accesibles a la detección por anticuerpos, la inmunodetección podría realizarse en el mismo gel pero este es demasiado frágil, no conservable y poco interpretable. Para ello se movilizan las bandas de oligopéptidos del SDS-PAGE hacia una membrana de nitrocelulosa o PVDF. Tal procedimiento puede realizarse por tres métodos: por difusión, que

simplemente por contacto membrana-gel en un tampón de transferencia las moléculas se movilizan quedando impregnadas en la membrana; por difusión al vacío, al método anterior se le añade el poder de succión de una bomba transfiriendo mayor cantidad de proteínas y en menor tiempo; pero la metodología ideal para el Western Blot es la electrotransferencia donde se usa una corriente eléctrica en sentido horizontal para que las proteínas del gel migren hacia la membrana permeable (BioRad, 2016).

Para cualquier técnica se utiliza un conjunto o sándwich: partiendo del polo negativo se deposita una esponja de 3 mm, se suma 3 a 4 papeles Whatman #3 recortados en las dimensiones de la esponja y empapados en tampón de transferencia, el gel de poliacrilamida previamente lavado con agua destilada y embebido en tampón se deposita sobre lo anterior, seguido se deposita la membrana de nitrocelulosa o PVDF según lo escogido, y por último de nuevo papeles filtro y esponja que compacte al cerrar el casete (BioRad, 2016). Todo se deposita en una cubeta llena de tampón de transferencia, y se conecta la fuente de poder con una potencia determinada, las proteínas se desplazarán hacia el polo positivo, y quedarán retenidas en la membrana.

La inmunodetección, como se encuentra en la figura 9, consiste en la hibridación de anticuerpos específicos con polipéptidos antigénicos inmovilizados en una membrana tras una separación electroforética. El proceso inicia con el recorte gentil de las tiras de nitrocelulosa, previamente transferidas, posterior a esto es necesario bloquear el material para minimizar espacios libres que hayan podido quedar de la transferencia. Sin este paso, el anticuerpo, que es de naturaleza proteica, podría unirse en estos sitios libres, y dificultar la distinción del complejo antígeno-anticuerpo que se trata de obtener. A continuación, se deposita la dilución apropiada del anticuerpo primario presente en el suero sanguíneo, este reconoce y se liga al antígeno objetivo fijado en la membrana. Se añade una dilución del anti-anticuerpo marcado con una enzima, este

elemento se une a cualquier isotipo de las inmunoglobulinas quedando fijado al complejo. Por último, se adhiere un substrato enzimático que resulta en la producción de un precipitado coloreado, fluorescente o luminiscente (BioRad, 2016).



1.2.6.3 Otras técnicas de detección

Las técnicas se basan en la observación directa al microscopio de protoscolexes y de ganchos rostellares en el aspirado quístico. También la aplicación de histopatología sobre la lámina germinal y técnicas de tinción vital con eosina, dan evidencias sobre la viabilidad del quiste. Además, actualmente se utiliza la amplificación de ADN parasitario para identificar la especie implicada (Hernandez, 2012).

Estas técnicas se llevan a cabo sobre biopsias o aspirados quísticos por lo cual tienen carácter confirmatorio. Sin embargo, por depender de procesos invasivos serían inviables como técnicas de diagnóstico rutinario.

1.2.7 Tratamiento

Para definir el tratamiento se considera en el paciente; edad, si es sintomático o no, contraindicaciones particulares por comorbilidades, posibilidades de seguimiento, la localización y características quísticas y la experiencia del equipo médico tratante.

La cirugía laparoscópica, toracoscópica o el PAIR, es el tratamiento de elección en los quistes hidatídicos pulmonares, los quistes hidatídicos sintomáticos hepáticos y de otras localizaciones, pero presentan riesgos mortales por el área de infección y la posibilidad de presentar reacciones anafilácticas (Moral, 2012).

El tratamiento farmacológico, con albendazol ha demostrado ser efectivo, presenta buena absorción gastrointestinal y biodisponibilidad. Se prescribe por máximo 6 meses en pacientes asintomáticos como profilaxis prequirúrgica, o en pacientes sintomáticos no complicados con contraindicaciones para cirugía (Moral, 2012; Ruano *et al.*, 2015).

El “observar y esperar” se basa en que gran proporción de los quistes siguen una evolución natural y espontánea hacia la calcificación, y los quistes que ya han llegado a este estadio van a ser estables y se mantendrán así. El período de tiempo adecuado para tal monitorización se calcula en 10 años, y se aplica a pacientes sin complicaciones y generalmente sin síntomas (OMS, 2011; Hernández, 2012).

Por último es importante mencionar el control y desparasitación de perros callejeros, además la vigilancia y cuidado de ganado conforman pilares para disminuir niveles de contagio (Moral, 2012; Álvarez, 2016). Actualmente en el mercado se encuentra una vacuna recombinante de administración hacia ungulados, Providean Hidatil EG 95 sintetizado a partir del gen que codifica la proteína EG95 en huevos de *Echinococcus granulosus*, brinda niveles de protección de hasta el 100% en animales vacunados con tres dosis (Tecnovax, 2017), cerrando el ciclo en este punto.

Capítulo 2

Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Coordinación Zonal 9-INSPI CZ9, Programa Nacional para el Abordaje Multidisciplinario de las Parasitosis Desatendidas en el Ecuador-PROPAD, Proyecto 2 “Implementación y estandarización ensayos de pruebas inmunológicas para el diagnóstico temprano de las parasitosis desatendidas en el Ecuador”. Se utilizaron muestras sanguíneas dispuestas por la seroteca del mismo programa y ejemplares parasitarios recolectados de un camal en la ciudad de Quito.

2.1 Antígenos parasitarios

2.1.1 Obtención de la muestra parasitaria

La investigación realizada por Estévez (2016) reporta que el ganado porcino faenado en la Empresa Metropolitana de Rastro Quito, presenta 1.15% de animales positivos para hidatidosis, pertenecientes a producciones caseras de las provincias de Pichincha, Santo Domingo de los Tsáchilas y Cotopaxi. Por tal razón la empresa de faenamiento conformó el lugar de recolección de los ejemplares parasitarios.

Gracias al apoyo proporcionado por los médicos veterinarios de turno se decomisó un hígado porcino entero que presentaba quistes uniloculares arraigados al parénquima del tejido en todos sus lóbulos. Para su evaluación y tratamiento, el tejido hepático entero fue trasladado a los laboratorios de INSPI CZ9-PROPAD-Proyecto 2, procurando mantener la temperatura menor a 8 °C para minimizar la acción de proteasas.

2.1.2 Tratamiento del fluido hidatídico

Escogiendo quistes grandes y semicirculares se extrajeron tres hidátides del parénquima hepático, como se observa en el anexo 2a. Tomando en cuenta protocolos de extracción *in house*, el fluido hidatídico se absorbió mediante jeringas estériles de 10 mL e inmediatamente se regresó el fluido extraído con la finalidad de homogenizar el contenido y obtener protoescólices para procesos de identificación. Posteriormente el líquido homogenizado se depositó en recipientes de 15 mL para ser centrifugado a 3500 RPM por 5 min. Como se observa en el anexo 2b el material se dividió en dos fases. Primero el sobrenadante que se recogió en tubos diferentes para inhibir proteasas y filtrar. Segundo se recogió una gota del sedimento o arenilla hidatídica en un cubreobjetos y se tiñó con eosina al 0.1% (Vallenas, Alvarado, Barrón, Perales, & Gavidia, 2013) para confirmar la presencia de protoescólices del género *Echinococcus*, visualizar la morfología y estadio de los parásitos, como se muestran en el anexo 2c. Luego se conservó a -30 °C.

Siguiendo el protocolo de inhibición de proteasas descrito por Ruano (2008), por cada 1.5 mL de sobrenadante recogido se administró 4 µL de aproptinina 100 UI/mL, 2 µL de chemostatin 1 mM, 2 µL de pestatina A 1 uM, 20 µL de PMSF 2 mM y 5 µL de EDTA 5 mM. Se dejó reaccionar por 15 min y nuevamente se centrifugo a 13 000 RPM a 4 °C durante 30 min. Luego, mediante un filtro Corning con poro de 0.2 µm estéril se purificó los extractos y finalmente, se alicuotó para ser conservados a -30 °C, hasta la cuantificación.

2.1.3 Cuantificación proteica

Los extractos antigénicos del fluido hidatídico se cuantificaron mediante el Kit QuantiPro BCA Assay Sigma Aldrich. El ensayo combina la reducción de complejos

Cu^{+2} -proteína a Cu^{+1} -proteína, y la detección selectiva del catión Cu^{+1} utilizando el ácido bicinconínico. El producto de la reacción tiene un color púrpura formado por la unión de ácido bicinconínico con un ion Cu^{+1} en medio alcalino. La cantidad de reducción es proporcional a la proteína presente (Sigma Aldrich, 2017).

Como se detalla en el manual previsto en el kit se prepararon por triplicado las muestras antigénicas y los reactivos necesarios para el procedimiento, los mismos que se observan en el anexo 3. Primero, el estándar proteico (Suero fetal bovino) proporcionado por la casa comercial de concentración 1 mg/mL se diluyó a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mezclando 0.1 mL de dicha solución en 1.9 mL de PBS 1X. Después se volvió a diluir a diferentes concentraciones: 0.0, 0.5, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 y 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para definir los puntos de la gráfica patrón.

Segundo, por triplicado las muestras del extracto antigénico se diluyeron a 1:40, 1:50, 1:58, 1:75, 1:100 y 1:122 con PBS 1X. Intervalos que se consideraron dentro de los puntos de la gráfica patrón, antes mencionada.

Por último, los tres reactivos de trabajo: QA, QB y la solución de sulfato cúprico, se mezclaron a los volúmenes requeridos para diluir en relación 1:1 con la muestra o estándar proteico. Se incubó por 2 horas a 37 °C. Finalizado el tiempo se dio lectura de las absorbancias a una longitud de onda de 562 nm y mediante el software Microsoft Office Excel se procesó los resultados y se interpretaron los datos obtenidos.

2.2 Identificación morfométrica de la especie

El procedimiento se realizó en los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana de Quito siguiendo la metodología descrita por Kaminsky (2003) y D'Alessandro & Rausch (2008). Se descongeló la arenilla

hidatídica conservada y se homogenizó extensamente para recoger una gota del material, esta se depositó en 0.2 mL de solución salina sobre un portaobjetos. A continuación, se cubrió con el cubreobjetos y se aplicó ligera presión en forma circular para desintegrar los protoescólices y liberar los ganchos rostelares.

Utilizando un microscopio compuesto marca Micros acoplado a una computadora, se localizaron 30 ganchos en posición plana con aumento a 40X. Mediante el software Motic Images Plus 2.0 se midieron los ganchos determinando la longitud total para luego ser comparada con valores reportados por WHO & OIE (2002), Kaminsky (2003), D'Alessandro & Rausch (2008) y Vizcaychipi *et al.*, (2012), detalles en Anexo 3a, 3b y 3c respectivamente.

2.3 Muestras de suero sanguíneo

El programa PROPAD dispone de sueros sanguíneos de niños y niñas de séptimo año de primaria de diferentes provincias del país. Se colectaron 40 muestras sanguíneas de las cuales 9 obtuvieron reacción positiva y 31 sueros fueron negativos mediante un análisis preliminar de cribado por la prueba ELISA Indirecto *casero* Proyecto 2 (“Implementar y estandarizar ensayos de pruebas inmunológicas para el diagnóstico temprano de las parasitosis desatendidas en el Ecuador”-PROPAD). Dichas muestras nuevamente se analizaron por cribado y posteriormente fueron evaluadas por el Kit Comercial NovaTec NovaLisa Echinococcus IgG ELISA, antes de ser valoradas por la técnica Western Blot para el diagnóstico de la hidatidosis humana.

2.3.1 Prueba ELISA Indirecto *casero*

Para el procedimiento, se utilizaron policubetas ELISA de poliestireno de 96 pocillos con fondo cóncavo. Entre cada etapa de la reacción, las placas fueron lavadas tres

veces con PBS pH 7.2 conteniendo 0.05% de tween 20 (PBS-T) en el equipo Biotek Elx50, indicado en el anexo 5a.

La concentración proteica del extracto de fluido hidatídico se diluyó a 10 µg/mL (Flores & Rodríguez, 2006; Fotoohi *et al.*, 2013), mezclando 86.6 µL del extracto parasitario en 9913.4 µL de tampón carbonato pH 9.6. Se adicionó 100 µL de la dilución en placas de ELISA estériles. Se incubó por 24 horas a 37 °C. Después se bloquearon las placas por 30 minutos a 37 °C con 230 µL por pocillo con 0.5% de caseína diluida en PBS-T.

Previamente se realizó la dilución 1:100 de los controles, un positivo y tres negativos obtenidos de la seroteca del programa y evaluados anteriormente mediante Kit Comercial NovaTec NovaLisa Echinococcus IgG ELISA. También se diluyeron 1:100 los sueros a analizar en solución de bloqueo. Se dispensó 100 µL por pocillo en el orden expuesto en el anexo 9a y 9b, y de igual forma se incubó a 37 °C por 25 minutos. Las muestras, controles y blanco se evaluaron por triplicado.

El conjugado, anti-anticuerpo producido en conejo (Anti-IgG Humana) ligado a la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) marca Sigma Aldrich, se diluyó 1:6000 en PBS-T 0.5 % de caseína para añadir 100 µL en todos los pocillos de la placa y se mantuvo a 37 °C por 20 minutos.

Se dejó reaccionar por 13 minutos a temperatura ambiente y en obscuridad, 100 µL por pocillo del substrato o-fenilendiamina (OPD) en la concentración de 0.4 mg/mL de tampón citrato fosfato 0.05 M pH 5.0 con adición de 0.4 µL/mL de peróxido de hidrógeno al 30 %. Para parar la reacción se sumó otros 100 µL por pocillo de ácido sulfúrico 3 M y pasados los 30 minutos se leyeron las absorbancias mediante el lector

de microplacas ELISA BioTek ELx808 (anexo 5b) a una longitud de onda de 490 nm con referencia de 630 nm.

El análisis de los datos se realizó en el programa Microsoft Office Excel donde, el punto de corte o cut off se calculó usando la media de tres muestras no reactivas más tres desviaciones estándar. La interpretación de los resultados se realizó en función a que muestras de sueros con valores inferiores al 10% por debajo del punto de corte se consideraron como reacción negativa y por el contrario muestras con valores superiores al 10 % se consideraron con reacción positiva. Las muestras con valores entre ± 10 % del punto de corte se tomaron como indeterminadas, por lo que no se consideraron en la evaluación

El ensayo es válido si los promedios de las absorbancias de los pocillos de blanco son menores a 0.1, si las absorbancias promedio de los controles negativos son menores al punto de corte y si las absorbancias del control positivo son mayor al punto de corte.

2.3.2 Kit Comercial NovaTec NovaLisa Echinococcus IgG ELISA.

Siguiendo la metodología descrita por la misma casa comercial NovaTec (2009), se utilizaron los controles y reactivos provistos en el kit (anexo 6) y 45 pocillos previamente bloqueados y recubiertos con antígenos de *Echinococcus multilocularis*.

Preliminarmente, las muestras de suero se diluyeron en relación 1:100 con el tampón de dilución de muestra provisto en el kit. Tomando un pocillo para el blanco, uno para el control negativo, dos pocillos para por duplicado colocar el control cut off, un pocillo para el control positivo y 40 pozos para evaluar individualmente cada muestra. Se incubó por 1 hora a 37 °C, 100 μ L de cada solución antes mencionada en el orden expuesto en el anexo 10a.

Después de la incubación, los pocillos se lavaron tres veces en el equipo Biotek Elx50 con la solución de lavado provista en el kit diluida con agua destilada a 1x, para pipetear 100 μ L por pocillo de la solución de IgG anti-humano conjugada con peroxidasa de rábano (HRP). Tras haber pasado 30 minutos reaccionando a temperatura ambiente se repitió el paso de lavado y se adicionó 100 μ L de substrato tetrametilbencidina (TMB) en todos los pocillos. Transcurrido 15 minutos se dispensó 100 μ L de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo en el que se adicionó el substrato.

Se midió las absorbancias resultantes a una longitud de onda de 450 nm con referencia de 620 nm en el equipo BioTek ELx808 a un periodo de 30 minutos después de añadir la solución de parada. Los datos se procesaron en el programa Microsoft Office Excel, tomando en cuenta que el punto de corte se calculó usando la media de los dos controles cut off, la interpretación de los resultados se realizó de igual manera que en la prueba ELISA Indirecto casero.

Como se menciona en el manual, para validar el ensayo el blanco debe tener una absorbancia menor a 0.1, el control negativo debe presentar absorbancia menor a 0.2 y menor al punto de corte, que los controles cut off tengan absorbancias entre 0.15 a 1.3 y que el control positivo sea mayor al punto de corte.

2.4 Western blot

2.4.1 SDS PAGE

Para la electroforesis en geles de poliacrilamida con presencia de sodio dodecilsulfato (SDS-PAGE) se siguieron los procedimientos descritos por BioRad (2016) y Sino Biological Inc. (2017) y se utilizó una cámara marca Labnet Enduro VE10 Vertical Gel Electrophoresis System (anexo 7a).

Utilizando los volúmenes detallados en la tabla 2, se establecieron geles de separación al 18 % y geles de concentración al 5 %, omitiendo la adición de SDS 10 % para mejorar la resolución de bandas proteicas (Buitrago, 2014). Ambos geles se mantuvieron en tampón de corrida pH 8.3 que contenía 3.03 g/L de tris base, 14.41 g/L de glicina, 1.0 g/L SDS diluidos en agua destilada.

Tabla 2.

Formulaciones geles SDS PAGE.

Reactivo	Gel separador 18 %	Gel concentrador 5 %
Agua destilada	1.2 mL	2.975 mL
Acrilamida 30%/bisacrilamida 0.8%	6 mL	0.67 mL
Tris HCl 0.5 M pH 6.8	-	1.25 mL
Tris HCl 1.5 M pH 8.8	2.6 mL	-
SDS 10 %	0.1 mL (Omitir)	0.05 mL (Omitir)
APS 10 %	0.1 mL	0.05 mL
Temed	0.01 mL	0.005 mL

Nota: Sino Biological Inc., 2017. (Modificado por el Autor)

Los extractos proteicos se mezclaron con tampón de muestra 4x (1:4, v/v), que contenía 2 mL de tris HCl pH 6.8 1.5 M, 3.2 mL de SDS 10%, 1.6 mL de glicerol, 0.4 mL de azul de bromofenol 1% y 0.8 mL de mercaptoetanol 14.3 M. Después de homogenizar dicha mezcla, se expuso a un ciclo de 99 °C por 10 min y otro a 4 °C por 10 min en un termociclador convencional Eppendorf, expuesto en el anexo 7b. Finalizada la desnaturalización, en los pocillos del gel concentrador, se cargó en el primer carril 5 µL del marcador de peso molecular PROMEGA Broad Range que contiene bandas de 225 kDa hasta 10 kDa. En los siguientes carriles se depositó 30 µL de extracto parasitario con ello se llegó a una concentración de 867.48 µg de proteína por carril.

La electroforesis se realizó con una fuente de poder marca Labnet Enduro 300V. Siguiendo la metodología de Thermo Fisher Scientific (2015), se utilizó una gradiente de corriente, iniciando con 13 mA por 1 hora y después se aumentó a 25 mA por 3

horas aproximadamente o hasta que el colorante azul de bromofenol llegue a la base del gel separador.

Seguido, se continuó con la transferencia proteica por campo eléctrico. No se coloreo el gel separador con azul de coomassie debido a que se une covalentemente a los radicales libres de los polipéptidos e imposibilita el proceso de transferencia (Yábar, 2003).

2.4.2 Electrotransferencia

Como detalla el manual de BioRad (2016), se remojaron en tampón de transferencia esponjas para electroblot de 3 mm y hojas de papel filtro de 0.4 mm de grosor, cortadas al tamaño adecuado para los soportes del sistema. El tampón de transferencia pH 8.3 contenía 3.03 g/L de tris base, 14.4 g/L de glicina, 200 mL/L de metanol diluidos en agua destilada.

Del proceso anterior se extrajo solamente el gel separador. Se cortó los restos del colorante azul de bromofenol y se lavó con agua destilada por 5 min en agitación. Por otros 5 min se depositó el gel en tampón de transferencia, al mismo tiempo se preactivó una membrana de nitrocelulosa GE Healthcare Amersham Protan Premium de 0.45 μm de grosor, en el mismo líquido.

Posteriormente, se ensambló en el siguiente orden: partiendo del polo negativo una esponja, cuatro hojas de papel filtro remojadas, el gel, la membrana preactivada, cuatro hojas de papel filtro y una esponja. Con la ayuda de un rodillo se eliminó las burbujas de aire presentes, se cerró el soporte y se preparó el sistema BioRad Mini Trans-Blot cell, llenando el tanque con tampón de transferencia.

El proceso se realizó en frío con la ayuda de pilas de hielo. La fuente de poder Labnet Enduro 300V se programó a 100mA por 1 hora. Culminado el proceso se retiraron las membranas de nitrocelulosa transferidas y se almacenaron a 4 °C entre dos hojas de papel filtro embebidas en PBS 1X.

2.4.3 Inmunodetección

Como detalla BioRad (2016) y Sino Biological Inc. (2017), las membranas fueron colocadas en el agitador rotatorio SciLogex SK-L330-Pro (anexo 8) por 10 min en agitación media con 50 mL de solución colorante 0.1 % rojo de ponceau. Después se destiñó por otros 10 min en agitación con 50 mL de agua destilada, así se logró evidenciar la transferencia de bandas y facilitó el recorte en tiras para analizar por Inmunoblot.

Individualmente se depositaron las tiras de nitrocelulosa en los canales del plato para Inmunoblot y seguido se dejó en agitación por 5 min con 2 mL de PBS 0.05 % tween 20 por canal para lavar y desteñir completamente, proceso que se repitió una vez. A continuación, se depositó 3 mL por canal de solución de bloqueo PBS 0.05% tween 20 conteniendo 5% leche descremada y se dejó en agitación por 1 hora a temperatura ambiente.

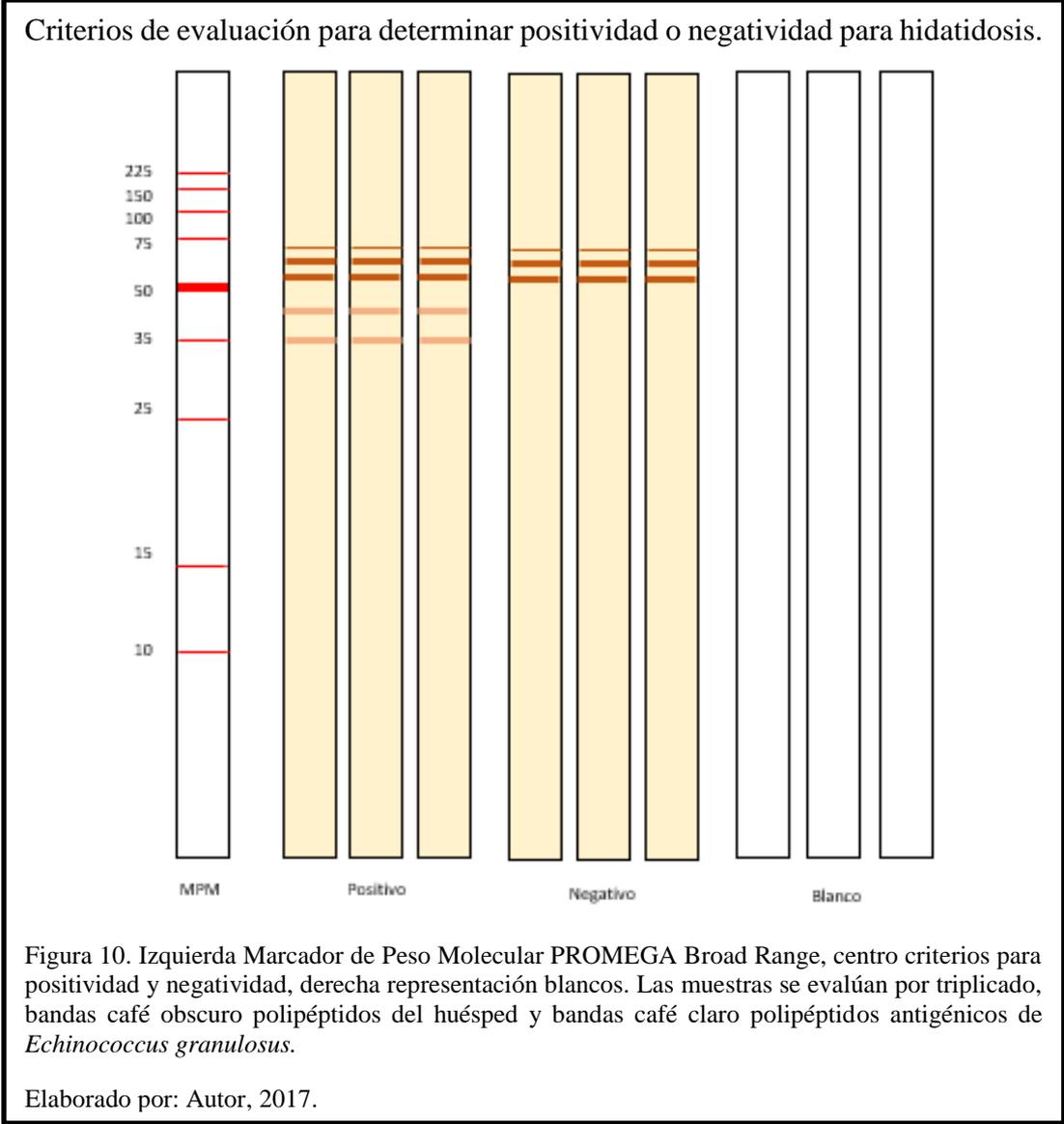
Posterior al bloqueo, se lavaron las tiras por tres veces con 3 mL de PBS 0.05 % tween 20 por canal en agitación por 5 minutos. Luego se incubó individualmente a temperatura ambiente por 1 hora en agitación las tiras de nitrocelulosa con 3 mL por canal de cada suero sanguíneo en una dilución 1:50 en solución de lavado.

Culminado el anterior proceso, nuevamente se lavaron las tiras tres veces, para sumar 3 mL por canal del conjugado, anti-anticuerpo producido en conejo (Anti-IgG

Humana) ligado a la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) marca Sigma Aldrich, en una dilución 1:6000 en PBS 0.05 % tween 20 y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora en agitación.

Después, se desarrolló un tercer lavado de igual forma por triplicado. Se añadió 3 mL por canal del substrato diaminobencidina (DAB) marca Sigma Aldrich 0.667 mg/mL en tampón tris salino (TBS) y 0.8 µL/mL de peróxido de hidrogeno al 30 %. Se mantuvo reaccionando en agitación por 12 min, se lavó por tres veces con 3 mL de agua destilada/canal en agitación por 5 minutos y se dejó secar para lograr visualizar los resultados cualitativamente.

Como establece Hassanain *et al.* (2014), se evaluaron por triplicado cada muestra sérica y además, se consideró al ensayo válido si las tiras de cada muestra arrojan el mismo patrón de bandeo. Los blancos se mantendrán sin coloración o bandeo alguno. Las tiras evaluadas con sueros negativos pueden presentar bandas antigénicas de 67.8 kDa, 53.8 kDa, 47.0 kDa que conforman monómeros proteicos del hospedador (Aziz *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013). Las tiras con sueros positivos deben presentar al menos 2 bandas antigénicas para hidatidosis: la primera de 43.5 kDa detallada como glicoproteína compartida entre las especies del género *Echinococcus*. (Carmena, Benito & Eraso, 2007) y la banda de 34.4 kDa monómero del Ag5 exclusiva de *E. granulosus* (Lorenzo *et al.*, 2005; Pagnozzi *et al.*, 2014), como se describe en la figura 10.



2.5 Análisis estadístico

Para definir valores de sensibilidad y especificidad de la técnica de Western Blot como método diagnóstico de la hidatidosis humana, se corroboraron los resultados de la inmunodetección contra las pruebas ELISA mencionadas anteriormente. Se utilizó una tabla de cuatro casillas para analizar los datos comparados, como se especifica en la tabla 3.

Tabla 3

Tabla de cuatro casillas.

		Comparación técnicas ELISA	
		Positivo	Negativo
Western Blot	Positivo	Verdaderos Positivos	Falsos Positivos
	Negativo	Falsos Negativos	Verdaderos Negativos

Nota: Flores & Rodríguez, 2006

La sensibilidad que se define como la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en una prueba diagnóstica un resultado positivo, se cuantificó mediante la fórmula:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} \times 100 \%$$

Tomado de: (Flores & Rodríguez, 2006)

La especificidad que refiere a la probabilidad de que un sujeto sano tenga un resultado negativo en una prueba diagnóstica, se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Falsos positivos} + \text{Verdaderos negativos}} \times 100 \%$$

Tomado de: (Flores & Rodríguez, 2006)

La repetibilidad que conforma el nivel de concordancia entre los resultados de las réplicas de la evaluación de una muestra, se probó mediante la valoración por triplicado de cada suero sanguíneo.

La determinación de las reacciones cruzadas se realizó en base a la identificación de las bandas antigénicas obtenidas en las tiras de nitrocelulosa tras la inmunodetección. Se analizó mediante referencias bibliográficas la capacidad del método analítico de detectar la relación antígeno-anticuerpo propia de la enfermedad.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1 Antígenos parasitarios

En la Empresa Metropolitana de Rastro Quito, se recogió un hígado porcino entero con la presencia de varios quistes uniloculares arraigados al parénquima del tejido en todos sus lóbulos, macroscópicamente las protuberancias eran de diferentes tamaños, todos de color blanco amarillento, de consistencia blanda con material mucoso en la superficie externa, como se observa en la figura 11. El ejemplar animal provenía de un criadero traspatio en el sector de Sangolquí-Pichincha, era una hembra Yorkshire de edad adulta, tamaño normal y peso menor al regular.

Hígado porcino entero infectado de hidátides uniloculares.



Figura 11. Tejido hepático con hidátides arraigadas al parénquima.

Capturado por: Autor, 2017.

Se extirpó según la metodología descrita en el capítulo anterior, tres quistes de forma circular, aspecto claro internamente, color blanco amarillento al exterior y de 43, 39 y 36 mm de diámetros respectivamente, los cuales según Fotoohi *et al.* (2013) y Hassanain *et al.* (2014) conforman hidátides viables con presencia de protoescólices invaginados adheridos a las paredes delgadas de las vesículas prolíferas, además el líquido hidatídico contendría productos antigénicos de excreción/secreción de la capa germinativa del metacestodo.

De las muestras parasitarias se obtuvo 50 mL de fluido y arenilla hidatídica, pudiendo localizar protoescólices invaginados viables mediante tinción con eosina al 0.1% en esta última fracción. Como se observa en la figura 12, los parásitos no adultos presentaron forma ovalada y el rostelo con una doble corona de ganchos y cuatro ventosas en disposición interna, lo cual hace referencia que la infección ya llevaba aproximadamente un año desarrollándose en el huésped porcino (Hernández, 2012; Silva, 2014).

Protoescólices *Echinococcus granulosus*, tinción con eosina 0.1%.



Figura 12. Tinción con eosina 0,1 % del parásito no adulto de *E. granulosus*. Protoscólex sin tinción es viable y con tinción está muerto.

Capturado por: Autor, 2017.

Utilizando el Kit QuantiPro BCA Assay Sigma Aldrich se cuantificó las proteínas presentes en el fluido hidatídico recogido. Como se muestra en la figura 13a, el valor de regresión fue del 99.7 %. Las ocho diluciones de la proteína estándar sirvieron para obtener los parámetros de regresión lineal para el cálculo de la concentración, mediante la siguiente formula:

$$X = \frac{\text{Promedio real} + 0.0103}{0.0071}$$

X=Valor concentración proteica de cada muestra en µg de proteína/mL de muestra.

Tomado de: Manual Kit QuantiPro BCA Assay Sigma Aldrich.

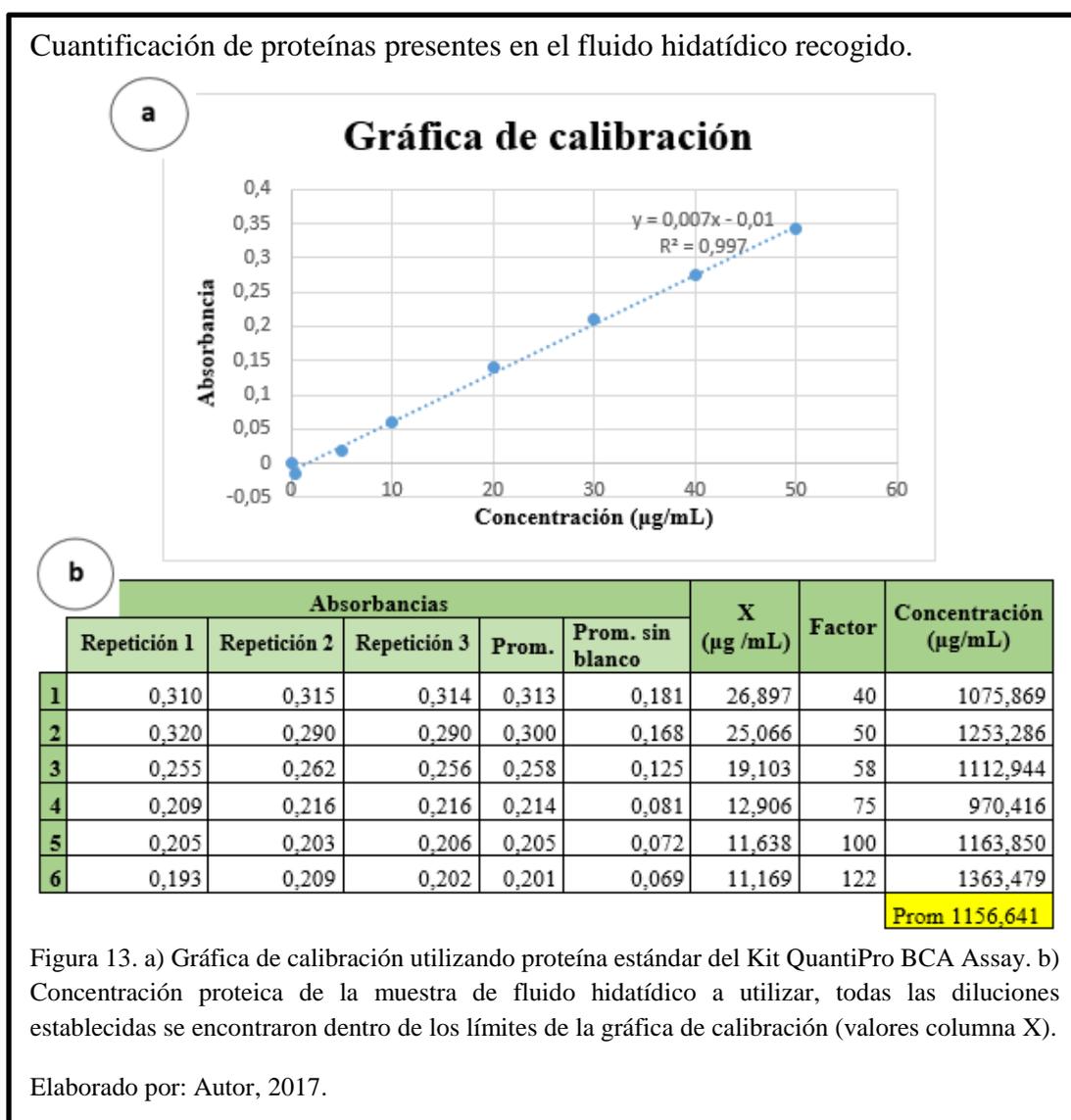


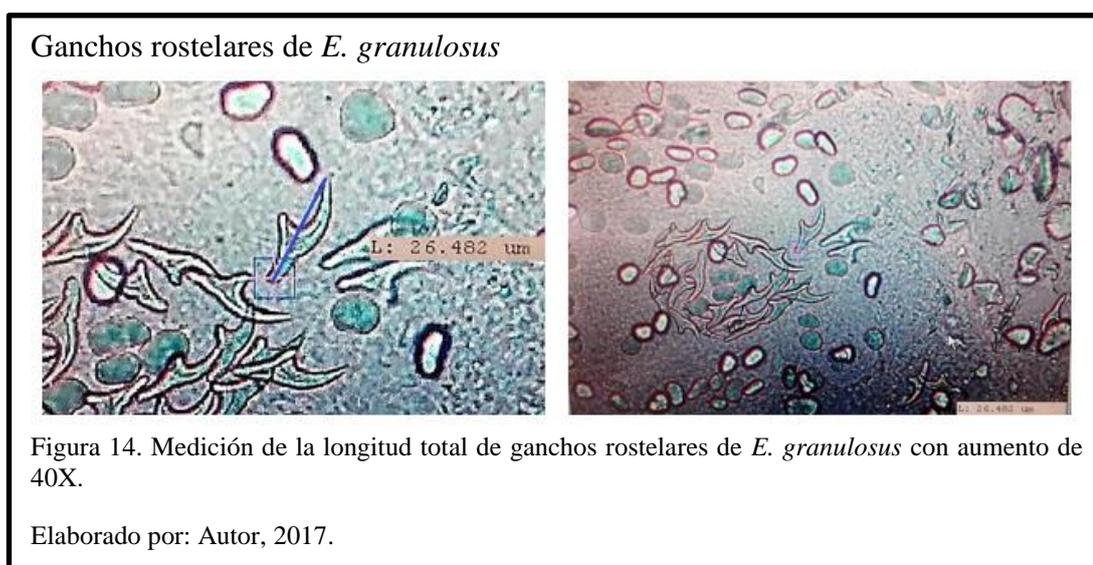
Figura 13. a) Gráfica de calibración utilizando proteína estándar del Kit QuantiPro BCA Assay. b) Concentración proteica de la muestra de fluido hidatídico a utilizar, todas las diluciones establecidas se encontraron dentro de los límites de la gráfica de calibración (valores columna X).

Elaborado por: Autor, 2017.

En la figura 13b se detallan las evaluaciones donde los valores de concentración proteica (X) se multiplican por el factor de conversión de las diluciones de las muestras. Por último se sacó promedio de las concentraciones unitarias obtenidas, resultando en 1156.641 μg de proteína/mL de muestra.

3.2 Identificación morfométrica de la especie *Echinococcus granulosus*

La observación microscópica a 40 X muestra la presencia de numerosos ganchos rostellares libres en sentido plano en toda la placa. Morfológicamente el mango presentaba mayor tamaño que la hoja, de 1 a 3 μm adicionales. Se detalla en la figura 14.



Se calculó el promedio general de la longitud total de una muestra de 30 ganchos, resultando en 27.367 μm , valores detallados en la tabla 4. Por lo cual se identificó la especie *Echinococcus granulosus* a través del estudio morfométrico de los ganchos rostellares. Además a continuación, se comparan los resultados con datos de distribución geográfica, hospederos definitivos e intermediarios dentro del ciclo biológico.

Tabla 4.

Longitud total ganchos rostelares de una muestra parasitaria del género *Echinococcus*.

Dimensiones longitud total de ganchos rostelares (μm)	
n1	26.482
n2	27.793
n3	30.434
n4	30.457
n5	25.272
n6	23.544
n7	27.793
n8	25.796
n9	26.149
n10	27.118
n11	29.747
n12	24.859
n13	27.232
n14	28.139
n15	25.932
n16	23.442
n17	28.221
n18	28.808
n19	27.039
n20	29.229
n21	27.746
n22	26.944
n23	29.059
n24	28.163
n25	27.289
n26	27.038
n27	29.058
n28	25.481
n29	28.642
n30	28.094
Promedio	27.367

Nota: Creado por el Autor, 2017.

WHO & OIE (2002), describen que *E. vogeli* presenta en su estadio larval protoescólices invaginados con pequeños ganchos rostelares de longitud total entre 32.5-34.0 μm , en el caso de *E. multilocularis* exhibe las mismas estructuras con extensión total entre 23.1-24.4 μm por lo cual ambas especies antropozoonóticas no identificarían a la muestra analizada. Por otro lado, protoescólices invaginados de *E. oligarthra* y *E. granulosus* lucen ganchos rostelares de dimensiones entre 25.4-27.3

μm y 22.6-27.8 μm respectivamente. Además, para diferenciar entre estas especies Kaminsky (2003), D'Alessandro & Rausch (2008) y Vizcaychipi *et al.*, (2012), mencionan que *E. vogeli* contiene la hoja curva y el mango constituye 2/3 del largo total, *E. oligartha* tiene el lomo de la hoja casi recto y el mango mide la mitad del largo del gancho, por otro lado *E. granulosus* presenta estructuras más pequeñas que los anteriores y que los mangos son más largos que las hojas.

Para corroborar los resultados Hernández (2012), Nakao *et al.* (2013) y Silva (2014) mencionan que la especie *E. granulosus* posee una distribución geográfica cosmopolita enfocándose en áreas endémicas como Sudamérica, como hospedero definitivo afecta a los cánidos y como hospederos intermediario enferma a los ungulados de granja. También analizando reportes sobre hidatidosis que afecta a la ganadería del Ecuador, Estévez (2016) aporta que el ciclo biológico del parásito en el país se transmite perro-cerdo u oveja-perro y que la especie encontrada en sus análisis conforma a *E. granulosus*.

3.3 ELISA Indirecto casero para el cribado de sueros sanguíneos

Mediante la prueba ELISA Indirecto casero que tiene una sensibilidad del 83.3 % y una especificidad del 93 % (Proyecto 2-Programa PROPAD-INSPI LIP CZ9), se analizaron 40 muestras sanguíneas provenientes de la seroteca del programa.

Las muestras serológicas de identificación 25, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 37, 38 tuvieron reacción positiva para hidatidosis. Los sueros con etiqueta 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 48, 49 se describieron con reacción negativa.

Como se detalla en la anexo 9c y 9d, los resultados del análisis de las muestras por la técnica mencionada cumplieron con los parámetros de validez. Para la placa 1 se obtuvo 0.046 de promedio de absorbancias para el blanco, 0.872 para el punto de corte con límite superior de 0.960 e inferior de 0.785, los controles negativos fueron menores al valor del corte y el control positivo fue aproximadamente el doble. Para la placa 2 el valor de absorbancia promedio para el blanco fue de 0.04. También se consiguió 0.8 como punto de corte con 0.88 y 0.72 para límites superior e inferior respectivamente, el punto de corte presentó mayor valor comparándose con los tres controles negativos.

3.4 Valoración muestras sanguíneas con Kit ELISA comercial

Utilizando el Kit Comercial NovaTec NovaLisa Echinococcus IgG ELISA que reporta sensibilidad y especificidad superiores al 95 % (NovaTec, 2009), se revalidó los resultados de las 40 muestras sanguíneas tras el anterior análisis.

Condensando los resultados minuciosos en el anexo 10b, los sueros con identificación 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 48, 49 resaltaron reacción negativa. Por otra parte, sueros de numeración 25, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 37, 38 tuvieron reacción positiva para hidatidosis.

Para asegurar la validez del ensayo el blanco presentó un valor de absorbancia de 0.032, estableciendo 0.2295 de promedio los controles cut off presentaron absorbancias dentro del rango, como límite superior e inferior arrojó 0.252 y 0.207 respectivamente, el control negativo exhibió absorbancia de 0.02 y el control positivo de 0.471.

Cultek (2006), Flores & Rodríguez (2006) mencionan que el ELISA se basa en la cuantificación de la reacción antígeno-anticuerpo inmovilizada sobre un soporte inmunoabsorbente, por lo tanto en este caso, el test conforma una importante herramienta de cribado y diagnóstico para detectar anticuerpos específicos contra la equinococosis, pero los resultados deben ser valorados por pruebas complementarias como Western Blot.

Por otro lado, para serodiagnóstico de quistes hidatídicos en humanos se puede utilizar antígenos derivados de protoescolices, pero Obal *et al.* (2012), Fotoohi *et al.* (2013) y Hassanain *et al.* (2014) analizan que antígenos provenientes del fluido hidatídico de quistes fértiles y viables recogidos de huéspedes intermediarios pueden ser usados como recursos más precisos para la detección por técnicas indirectas como Inmunoblot o ELISA Indirecto, esta ventaja se debe a la liberación de productos antigénicos por parte de la capa germinativa y parásitos en desarrollo. Además que mientras mayor es la proliferación del quiste mayor será la concentración antigénica en el líquido interno.

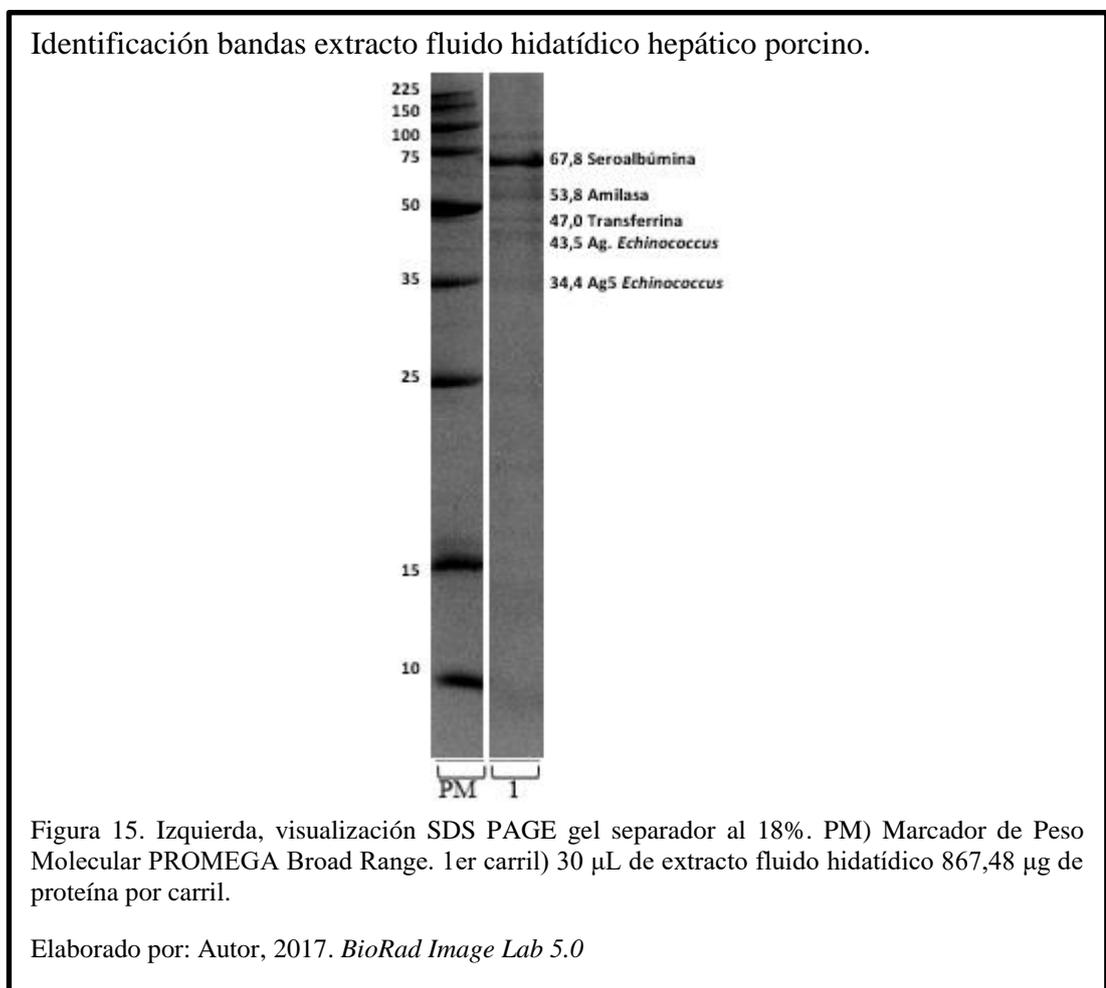
3.5 Identificación antígenos de *Echinococcus granulosus* por SDS PAGE

Se reconocieron cinco bandas de polipéptidos resultantes de la electroforesis vertical en geles de poliacrilamida con presencia de sodio dodecil sulfato. Las bandas de 67.8 kDa, 53.8 kDa, 47.0 kDa, conforman monómeros desnaturalizados y reducidos de glicoproteínas y lipoproteínas del hospedador. Por otro lado, las bandas de 43.5 kDa y 34.4 kDa conforman antígenos parasitarios diluidos en el fluido hidatídico. Se presenta en la figura 15.

Según Aziz *et al.* (2011) y Li *et al.* (2013) la banda gruesa de 67.8 kDa pertenece a la proteína más abundante del plasma, la seroalbúmina, que en el líquido del quiste proporciona energía a las larvas (Malik, Al-Senaidy, Skrzypczak-Jankun & Jankun,

2013). Las bandas de 53.8 kDa, 47.0 kDa conforman moléculas de amilasa y transferrina respectivamente (Bano, Qader, Aman, Syed & Azhar, 2011; Pérez, Gutiérrez, Cervantes & Alcalde, 2011).

Carmena *et al.* (2007) mencionan que la banda de 43.5 kDa es resultado de la reducción y desnaturalización de una glicoproteína compartida entre las especies del género *Echinococcus*. Lorenzo *et al.* (2005) y Pagnozzi *et al.* (2014) hace referencia que la banda de 34.4 kDa conforma un monómero del Ag5. Por tales motivos, estas bandas se tomaran en cuenta para el inmunodiagnóstico.



3.6. Western Blot

Posterior a la electrotransferencia se evaluó por inmunoblot las 40 muestras séricas anteriormente descritas, efecto de ello se obtuvo 31 sueros negativos y 9 positivos para

hidatidosis causada por el parásito *Echinococcus granulosus*, concordando en los resultados obtenidos en el cribado por la prueba ELISA Indirecto y el Kit Comercial NovaTec NovaLisa Echinococcus IgG ELISA. Como se expone en la figura 16, los blancos se mantuvieron sin reaccionar, las muestras positivas definieron notoriamente las bandas de 43.5 kDa y 34.4 kDa determinadas como antígenos parasitarios, las tiras negativas presentaron lineado de 67.8 kDa, 53.8 kDa, 47.0 kDa que conforman monómeros proteicos del hospedador.

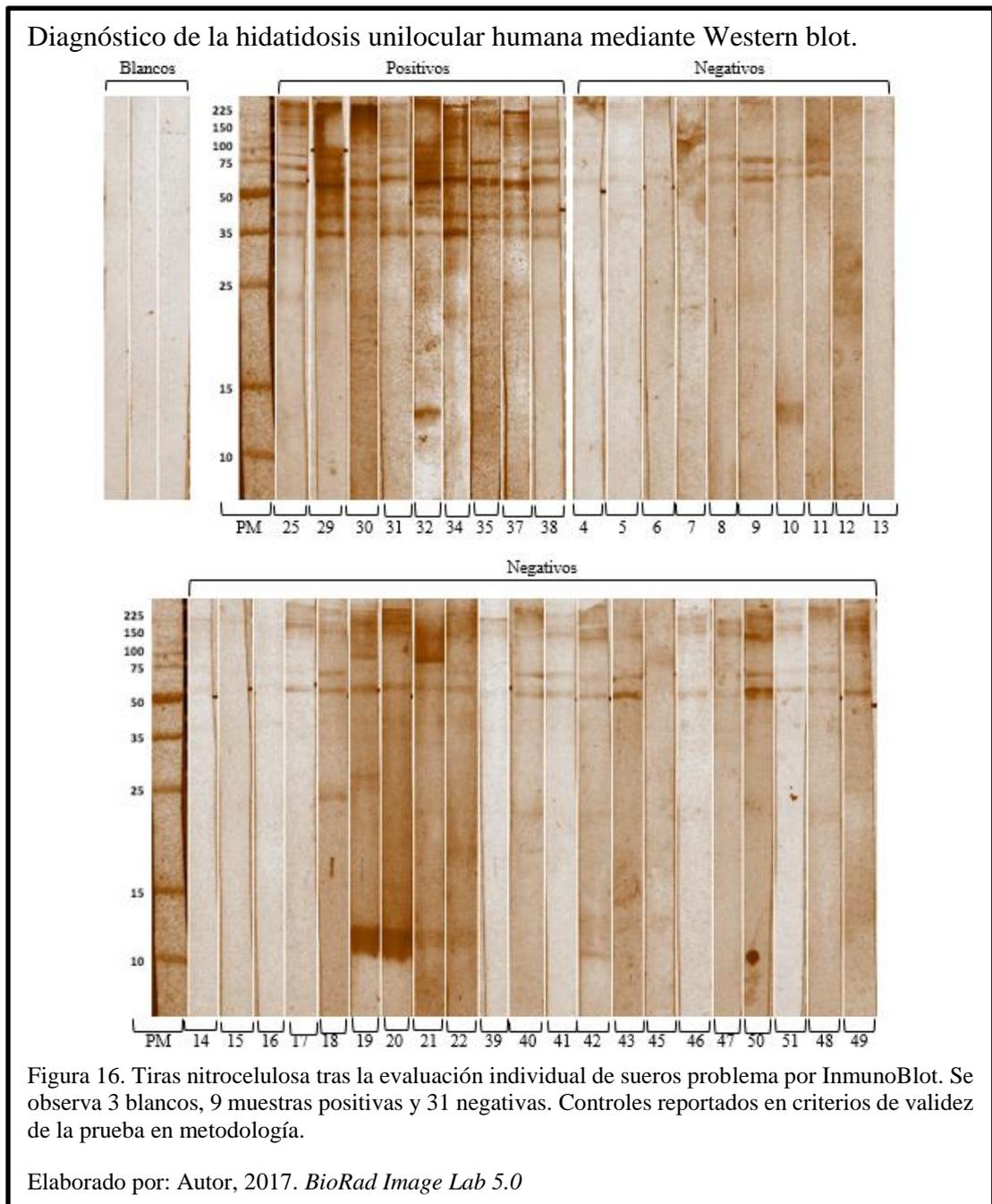


Figura 16. Tiras nitrocelulosa tras la evaluación individual de sueros problema por InmunoBlot. Se observa 3 blancos, 9 muestras positivas y 31 negativas. Controles reportados en criterios de validez de la prueba en metodología.

Elaborado por: Autor, 2017. *BioRad Image Lab 5.0*

Los sueros con identificación 25, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 37, 38 presentan tanto bandas no definitivas de 67.8 kDa y 53.8 kDa, como lineado antigénico de 43.5 kDa y 34.4 kDa, por ello se concretan como positivas para hidatidosis. En cuanto a las muestras con etiqueta 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 48, 49 se catalogaron como negativas ya que no señalan bandas propias del parásito pero si polipéptidos de 67.8 kDa y 53.8 kDa. También, en el anexo 11 se exhibe la totalidad de muestras analizadas por triplicado, las cuales no presentaron burbujas por transferencia o manchas difusas que limiten la lectura.

3.7 Análisis e interpretación de resultados

Analizando de forma individual los resultados de las muestras evaluadas por las tres metodologías serológicas de diagnóstico para la hidatidosis humana, se obtuvo las mismas derivaciones en cada prueba. Como se expone en la tabla 5, los sueros con numeración 25, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 37, 38 demuestran ser positivas para la presencia del parásito *E. granulosus*. En cambio las muestras sanguíneas con identificación 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 50, 51, 48, 49 se definieron como negativas para para el grupo de pruebas procesadas.

Tabla 5.

Comparación individual de los resultados obtenidos de las tres metodologías serológicas.

Muestra	Kit comercial	ELISA Indirecto casero	Western Blot	Muestra	Kit comercial	ELISA Indirecto casero	Western Blot
25	Positivo	Positivo	Positivo	19	Negativo	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo	20	Negativo	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo	Negativo	21	Negativo	Negativo	Negativo
6	Negativo	Negativo	Negativo	22	Negativo	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo	Negativo	34	Positivo	Positivo	Positivo
8	Negativo	Negativo	Negativo	39	Negativo	Negativo	Negativo
29	Positivo	Positivo	Positivo	40	Negativo	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo	Negativo	41	Negativo	Negativo	Negativo
10	Negativo	Negativo	Negativo	42	Negativo	Negativo	Negativo
11	Negativo	Negativo	Negativo	43	Negativo	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo	Negativo	35	Positivo	Positivo	Positivo
13	Negativo	Negativo	Negativo	45	Negativo	Negativo	Negativo
30	Positivo	Positivo	Positivo	46	Negativo	Negativo	Negativo
14	Negativo	Negativo	Negativo	47	Negativo	Negativo	Negativo
15	Negativo	Negativo	Negativo	37	Positivo	Positivo	Positivo
16	Negativo	Negativo	Negativo	38	Positivo	Positivo	Positivo
17	Negativo	Negativo	Negativo	50	Negativo	Negativo	Negativo
18	Negativo	Negativo	Negativo	51	Negativo	Negativo	Negativo
31	Positivo	Positivo	Positivo	48	Negativo	Negativo	Negativo
32	Positivo	Positivo	Positivo	49	Negativo	Negativo	Negativo

Nota: Creado por el Autor, 2017.

En la figura 17, observamos que de las 40 muestras determinadas para la evaluación de la técnica Western Blot como método diagnóstico de la equinocosis, 9 (22.5%) resultaron positivas frente a la parasitosis. Por el contrario, 31 (77.5%) sueros mostraron respuesta negativa, lo que corrobora las derivaciones obtenidas de las tres metodologías.

Comparación de los resultados obtenidos de las tres metodologías serológicas.

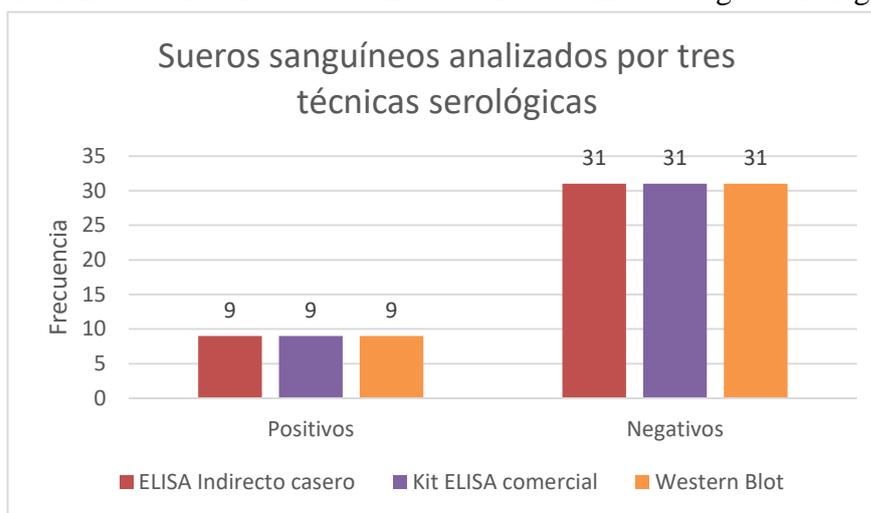


Figura 17. Resultados evaluación de 40 muestras sanguíneas, 9 con reacción positiva y 31 con reacción negativa por ELISA Indirecto *casero*, kit comercial NovaTec NovaLisa Echinococcus IgG ELISA y Western Blot.

Elaborado por: Autor, 2017.

La sensibilidad y especificidad de la técnica Western Blot para el diagnóstico de la hidatidosis humana se obtuvieron tras contrastar los resultados de la inmunodetección contra los efectos de las pruebas ELISA mencionadas anteriormente. Dicha comparación se expone en la tabla 6.

Tabla 6.

Tabla de cuatro casillas, comparación resultados Western Blot y pruebas ELISA.

		Comparación técnicas ELISA	
		Positivo	Negativo
Western Blot	Positivo	9	0
	Negativo	0	31

Nota: Flores & Rodríguez, 2006 (Modificado por el Autor).

Como se destaca en las ecuaciones siguientes la sensibilidad y especificidad obtenida fue de 100%, ya que la técnica de diagnóstico planteada en este estudio arrojó los mismos resultados que las pruebas ELISA desarrolladas. Además, es importante mencionar que no presentó evidencia de falsos positivos o falsos negativos. Cabe

recalcar que el número de muestras analizadas son 40, lo cual puede conformar un factor que iguale dichas metodologías.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{9}{9+0} \times 100 \% = 100 \%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{31}{0+31} \times 100 \% = 100 \%$$

Tomado de: (Flores & Rodríguez, 2006)

En este estudio no se determinó el porcentaje de reacciones cruzadas con otras helmintiasis ya que no se encontró resultados falsos positivos con ninguna de las muestras de sueros testeados. Sin embargo según los reportes de Flores & Rodríguez (2006), Carmena *et al.* (2007), Hernández (2012), Álvarez (2016) y LDBIO Diagnostics (2016) existe reacciones cruzadas con *Taenia solium*, *Hymenolepis nana*, toxocariasis, oncocercosis y angiostrongyloidiasis.

Según el INEC en los años 2014, 2015, 2016 el Ecuador ha presentado respectivamente 829, 846, 963 casos de ingresos hospitalarios por cuadros graves de helmintiasis. Estudiando las parasitosis que manifiestan reacciones cruzadas con *Echinococcus granulosus*, se encontró que para angiostrongyloidiasis se reporta un caso en el año 2008 en la provincia de Los Ríos (Berger, 2017). Para teniasis y cisticercosis hubo 171 ingresos en hospitales del país (INEC, 2016). Por otra parte, la iniciativa y ejecución del Programa Nacional de Eliminación de la Oncocercosis, Ministerio de Salud Pública del Ecuador propone a finales de los años '90 la erradicación de la parasitosis principalmente en la provincia de Esmeraldas (Chiluisa, 2006), actualmente se tiene conocimiento de un caso en un anciano mayor a los 65 años de edad residente de la provincia de Guayas (INEC, 2014). Los otros parásitos se

encuentran como no clasificados por lo cual no es posible identificar situaciones puntuales. También cabe mencionar que la mayoría de casos se asisten en pacientes de edades avanzadas donde las parasitosis se encuentra en estadios avanzados y podrían comprometer la vida del infectado.

La hidatidosis humana está catalogada entre una de las más peligrosas enfermedades producidas por cestodos. Sin embargo pese a este factor y contando con los procedimientos sofisticados actuales, es difícil normalizar el porcentaje de exclusividad. Varios estudios muestran que la mayoría de test serológicos exhiben reacciones cruzadas con sueros de pacientes positivos a otro parásito perteneciente al género, *Echinococcus multilocularis* (Flores & Rodríguez, 2006; Carmena *et al.*, 2007; Hernández, 2012; Álvarez, 2016).

Con referencia a este hecho WHO & OIE (2002), Lorenzo *et al.* (2005) y Pagnozzi *et al.* (2014) mencionan que macromoléculas de diversos pesos moleculares portadoras de háptenos fosforilcolina han sido detectados tanto en extractos como en productos obtenidos a partir de parásitos de la familia Taeniidae.

Como describe LDBIO Diagnostics (2016) la técnica de Western Blot IgG para hidatidosis humana se trata de un análisis cualitativo de diagnóstico serológico de IgG mediante una prueba de inmunotransferencia de la equinocosis unilocular previsto para las pruebas confirmatorias de un resultado positivo o ambiguo obtenido por medio de pruebas diagnósticas clásicas, como la prueba ELISA o la aglutinación en látex.

A pesar de casi cincuenta años de investigación activa, el inmunodiagnóstico de la equinocosis unilocular sigue siendo un desafío. Muchas plataformas de ensayo han sido ideadas, incluida la hemaglutinación indirecta, la aglutinación de látex inmunofluorescencia, inmunoelectroforesis, inmunoblotting, y ELISA, que se basan

en varios antígenos preparados a partir de antígenos somáticos como protoescolex puros o antígenos de excreción/secreción como el líquido hidatídico (Lorenzo *et al.*, 2005; Pagnozzi *et al.*, 2014).

En los últimos quince años, antígenos purificados nativos, recombinantes, o proteínas y péptidos sintéticos han sido cada vez más evaluados. Los antígenos de *E. granulosus* se consideran muy inmunogénicos, sin embargo y como se confirma por Western blot en este trabajo, quistes hidatídicos activos no desarrollan una reacción humoral detectable contra AgB. Pero, el uso de Ag5, parcial o altamente purificado permite aumentar significativamente la solidez de los resultados de diagnóstico (Álvarez, 2016).

Por otro lado, los kits serológicos disponibles comercialmente son en su mayoría basados en el fluido crudo de quistes hidatídicos como antígeno diana debido a su facilidad de preparación, así como su disponibilidad en áreas endémicas. Sin embargo, su forma cruda generalmente contiene una mezcla compleja de proteínas del huésped, representadas principalmente por proteínas del suero sanguíneo, junto con las proteínas liberadas por *E. granulosus* (NovaTec, 2009; LDBIO Diagnostics, 2016). En este trabajo, el Western Blot subraya la extrema heterogeneidad en la concentración de proteína y la composición del fluido hidatídico de quistes hepáticos porcinos, lo que conduce a una intensidad variable de la respuesta de anticuerpos medida con ensayos serológicos (Aziz *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013).

Conclusiones

El fluido del metacestodo de *Echinococcus granulosus* obtenido a partir de tejido hepático de ganado porcino infectado, sirve como fuente de antígeno para el inmunodiagnóstico basado en ELISA Indirecto y Western Blot.

De acuerdo a la medición de la longitud total de ganchos rostelares propios de protoescolex recogidos de quistes hepáticos porcinos y comparación bibliográfica de resultados, se identificó morfométricamente a la especie *Echinococcus granulosus* causante de la equinococosis unilocular.

Mediante análisis de 40 muestras séricas y corroboración de resultados por la técnica de ELISA Indirecto *in house* (PROPAD-INSPI) y el Kit Comercial NovaTec NovaLisa Echinococcus IgG ELISA, Western blot se define como metodología 100% sensible y específica para el diagnóstico de la hidatidosis humana, siendo una prueba fiable y reproducible para dicho fin.

Con el presente trabajo de investigación, se acepta la hipótesis que al menos una de las muestras de suero sanguíneo seleccionadas y evaluadas por la prueba ELISA coincide a los resultados por Western Blot. La total concordancia en resultados de reacciones positivas y negativas entre técnicas permite asentar la hipótesis planteada.

Recomendaciones

Convalidar los resultados y aumentar el número de muestras para tener mayor confiabilidad de las metodologías mencionadas en este estudio y enfocar los procedimientos a gran escala.

Corroborar los resultados obtenidos de identificación de especie con métodos moleculares de amplificación genómica. La tipificación morfométrica de la especie *Echinococcus granulosus* no conforma un método definitivo.

Aplicar las técnicas serológicas detalladas en este trabajo como asistencia a otras metodologías para esclarecer la posible infección de equinocosis a pacientes. La visualización macroscópica del quiste en cirugía, o de estructuras parasitarias observadas al microscopio conforman los únicos procesos de diagnóstico de certeza.

En el Ecuador no existen investigaciones acerca de métodos para el diagnóstico de la hidatidosis humana, ni para otras parasitosis desatendidas, por lo que es crucial darle énfasis a esta temática que viene aumentando su propagación y podría desencadenar a futuro mayores complicaciones en la región.

Los programas de diagnóstico, tratamiento y vigilancia de las parasitosis convendrían ser de tipo permanente ya que la equinocosis es una parasitosis zoonótica crónica mortal que acostumbra afectar a estudiantes de primaria y secundaria, y desarrollar mucho después síntomas.

Bibliografía

- Álvarez, C. (2016). Epidemiología molecular de *Echinococcus granulosus* en las Américas: implicaciones para el control y diagnóstico. *Parasitología Latinoamericana*; 65 (3): 5 – 19
- Aziz, A., Zhang, W., Li, J., Loukas, A., McManus, D.P. & Mulvenna, J. (2011). Proteomic characterization of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *J. Proteomics* 74, 1560–72.
- Bano, S., Qader, S. A. U., Aman, A., Syed, M. N., & Azhar, A. (2011). Purification and characterization of Novel α -Amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *AAPS PharmSciTech*, 12(1), 255–261. <http://doi.org/10.1208/s12249-011-9586-1>
- Berger, S (2017). Infectious diseases of Ecuador. GIDEON Informatics, Incorporated, 20 ene. 2017 - 325 pág.
- Bio Rad. (2016). Protein Blotting Guide, Electrophoresis and blotting. Bio Rad Laboratories Inc. Recuperado el 4 de marzo de 2017, de Bio Rad: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2895.pdf
- Brusca, R. & Brusca, G. (2003). Invertebrates, 2^a edition. Sinauer Associates Inc., 922 pag. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Buitrago, J. (2014). Estudio de la expresión de proteínas en el modelo *Leishmania*-Macrófago con énfasis en canales iónicos. Grupo de Investigación Biofísica y Biología de Membranas. Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Carmena, D., Benito, A. & Eraso, E. (2007) The immunodiagnosis of *Echinococcus multilocularis* infection, In *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 13,

Issue 5, 2007, Pages 460-475, ISSN 1198-743X,
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01665.x>.

Centers for Disease Control and Prevention, CDC (2012). Echinococcosis, Biology.

Recuperado el 5 de octubre de 2017, de CDC:
<https://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/biology.html>

Chiluisa, V. (2006). Determinación por PCR-ELISA de la reducción de la tasa de infección natural de las principales especies vectoras de *Onchocerca volvulus*, luego de la distribución masiva de Ivermectina (Mectizan®) en las comunidades centinela del foco endémico principal del río Cayapas en la Provincia de Esmeraldas. Ingeniería en Biotecnología, Facultad de Ciencias Aplicadas Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador.

Cultek. (2006). Fundamentos y tipos de ELISAs. Recuperado el 18 de octubre de 2017, de Cultek: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf>

D'Alessandro, A., & Rausch, R. (2008). New aspects of neotropical polycystic (*Echinococcus vogeli*) and unicystic (*Echinococcus oligarthrus*) echinococcosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(2), 380–401.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00050->

Díaz, A., Casaravilla, C., Irigoín, F., Lin, G., Previato, J. & Ferreira, F. (2011). Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure. *Trends Parasitol.* 27, 204–13.

- Díaz, A., Fernández, C., Pittini, A., Seoane, P., Allen, J. & Casaravilla, C. (2015) The laminated layer: Recent advances and insights into *Echinococcus* biology and evolution. *Experimental Parasitology* 158, 23–30
- Estévez, G. (2016). Prevalencia de hidatidosis en cerdos faenados en la Empresa Pública Metropolitana de Rastro de Quito (EMRAQ-EP), en el cantón Quito, provincia de Pichincha, Ecuador. Universidad de las Américas, Ecuador.
- Fica, A. & Weitzel, T. (2014). Gastos hospitalarios en pacientes con fascioliasis en fase aguda, hidatidosis de tratamiento quirúrgico y neurocisticercosis en un hospital general en Chile. Hospital Militar de Santiago, Clínica Alemana de Santiago, Universidad del Desarrollo, Chile.
- Flores, A. & Rodríguez, P. (2006). Estandarización de la prueba de ELISA para el inmunodiagnóstico de hidatidosis humana empleando antígeno de producción local. Laboratorio de Inmunología SEDILAB, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón, Bolivia.
- Fotoohi, S., Hashemi, G. & Borji, H. (2013) Serodiagnosis of human hydatidosis with an ELISA developed based on antigens derived from sheep hydatid cysts and comparison with a commercial human ELISA kit. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
- Golzari, S. & Sokouti, M. (2014). Pericyst: The outermost layer of hydatid cyst. *World Journal Gastroenterology* 7; 20(5): 1377-1378

- Hassanain, M., Shaapan, R. & Khalil, F. (2014). Sero-epidemiological value of some hydatid cyst antigen in diagnosis of human cystic echinococcosis. Indian Society for Parasitology. J Parasit Dis.
- Hernández, A. (2012). Validación de un nuevo antígeno recombinante para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con hidatidosis, y su aplicación a un test comercial. Tesis Doctoral, Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología Edafología y Química Agrícola, Universidad de Salamanca, España.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, INEC. (2016). Anuario de Estadísticas Hospitalarias: egresos y camas. Dirección de Estadísticas Sociodemográficas, Organismo Gobierno del Ecuador.
- Kaminsky, R. (2003). Manual de Parasitología, Métodos para Laboratorios de Atención Primaria de Salud, 2da edición. Dirección de Investigación Científica, Universidad Nacional Autónoma de Honduras y Hospital-Escuela. Tegucigalpa, Honduras.
- LDBIO Diagnostics. (2017). *Echinococcus* Western Blot IgG. Prueba de inmunotransferencia para el diagnóstico *in vitro*. Recuperado el 29 de noviembre de 2017, de LDBIO Diagnostics: http://www.ldbiodiagnostics.com/fichiers_site/a1181ldb/contenu_pages/wb_ech_vs11_es.pdf
- Littlewood, D. (2006). The Evolution of Parasitism in Flatworms, in: Maule, A.G., Marks, N.J. (Eds.), Parasitic Flatworms: Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Physiology. CABI, Wallingford, UK, p. 448.

- Li, J., Ju, Y., Wang, X., Zhang, Z., Li, J., Zhu, M. & Zhao, W. (2013). Analysis of the chemical components of hydatid fluid from *Echinococcus granulosus*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 46(5):605-610
- Lorenzo, C., Last, J., González, G. (2005). The immunogenicity of *Echinococcus granulosus* antigen 5 is determined by its post-translational modifications. *Parasitology* 131: 669–77
- Lucena, J. (2006). Epidemiología de la hidatidosis en el ganado porcino a nivel de matadero municipal de Guayaquil. Universidad de Guayaquil, Ecuador.
- Malik, A., Al-Senaïdy, A., Skrzypczak-Jankun, E., & Jankun, J. (2013). Isolation and characterization of serum albumin from *Camelus dromedarius*. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 6(2), 519–524.
<http://doi.org/10.3892/etm.2013.1145>
- Moral, M. (2012). Enfermedades infecciosas. Diagnóstico Hidatidosis. Guía para el Equipo de Salud. Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud, Ministerio de Salud de la Nación, Argentina.
- Nakao, M., Lavikainen, A., Yanagida, T., Ito, A., (2013). Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *Int. J. Parasitol.* 43, 1017–29.
- NovaTec. (2009). *Echinococcus*. NovaLisa *Echinococcus* IgG-ELISA. NovaTec Immunodiagnostica GMBH, Alemania.
- Obal, G., Ramos, A., Silva, V., Lima, A., Batthyany, C., Bessio, M., Ferreira, F., Salinas, G., Ferreira, A. (2012). Characterisation of the Native Lipid Moiety of *Echinococcus granulosus* Antigen B. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6 (5): e1642

- Organización Mundial de la Salud, OMS. (2011). Echinococcosis, epidemiology. Recuperado el 5 de octubre de 2017, de OMS: <http://www.who.int/echinococcosis/epidemiology/en/>
- Organización Mundial de la Salud, OMS. (2017). Helmintiasis transmitidas por el suelo. Recuperado el 5 de octubre de 2017 de OMS: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/es/>
- Pagnozzi, D., Biosa, G., Addis, M., Mastrandrea, S., Masala, G., Uzzau, S. (2014) An Easy and Efficient Method for Native and Immunoreactive *Echinococcus granulosus* Antigen 5 Enrichment from Hydatid Cyst Fluid. PloS ONE 9(8): e104962.
- PANAFTOSA (2015). Equinococosis. Informe Epidemiológico en la Región de América del Sur – 2009-2014. Iniciativa para el control de la Equinococosis quística: Argentina, Brasil, Chile, Perú y Uruguay. Salud Pública Veterinaria, Organización Panamericana de Salud y Organización Mundial de la Salud.
- Pérez, M., Gutiérrez, J., Cervantes, I. & Alcalde, M. 2011. Fibre production in South American camelids and other fibre animals. Springer Science & Business Media, 248
- Ruano, A., Félix, C., Tarupi, W., Herrera, M. & Gutierrez, P. (2015). Manual: Guía de práctica clínica para el manejo terapéutico de las parasitosis desatendidas. Proyecto cinco: Resistencia Antiparasitaria y Perspectivas de uso de Extractos de Plantas Nativas en ensayos Pre-Clínicos. Programa Nacional para el Abordaje Multidisciplinario de las Parasitosis Desatendidas, Ecuador.

- Ruano, A. (2008). Óxido nítrico como modulador de la estrongiloidosis. Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola. Universidad de Salamanca, España.
- Sánchez, E., Cáceres, O., Náquira, C. (2004). Aislamiento y purificación de una fracción antigénica de 21 a 31 kDa de líquido de quiste hidatídico de *Echinococcus granulosus*. Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud, Perú.
- Sánchez, E., Náquira, C., Vega, E., Miranda, E., Quispe, W., Ayala, E. (2010) Manual de procedimientos para el diagnóstico serológico de las zoonosis parasitarias. Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud, Perú.
- Sánchez, J. (2010). ¿Cómo se estudian las inmunoglobulinas? Curso de Introducción a la Inmunología Porcina 3ra Edición. Recuperado el 18 de octubre de 2017 de Sanidad Animal: <http://sanidadanimal.info/cursos/inmunologia3/ca051.htm>
- Silva, M. (2014). Caracterización estructural y funcional del Antígeno B de *Echinococcus granulosus*. Tesis para Título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas en el Área Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Sigma Aldrich. (2017). Protein Quantitation, Bicinchoninic Acid Kit. Recuperado el 9 de diciembre de 2017 de Sigmaaldrich: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/protein-quantitation/bicinchoninic-acid-kit.html>
- Sino Biological Inc. (2017). Electrophoresis. SDS-PAGE Protocol. Recuperado el 26 de octubre de 2017, de Assay-Protocol: <http://www.assay-protocol.com/molecular-biology/electrophoresis/denaturing-page>

- Tecnovax. (2017). Hidatil EG 95, La vacuna. Recuperado el 19 de octubre de 2017 de Tecnovax, Hidatidosis: <http://www.hidatidosis.com.ar/hidatil.html>
- Thermo Fisher Scientific. (2015). SDS PAGE Protocols. Recuperado el 20 de marzo de 2017 de Thermofisher: <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/sds-page-protocol.html>
- Tisalema, E. (2007). Conocimientos actuales sobre hidatidosis en el Ecuador. Guayaquil: Leopoldo Izquieta Pérez., Ecuador.
- Universidad Nacional de Quilmes, UNQ. (2008). TP3: Electroforesis en gel de poliacrilamida. Recuperado el 19 de octubre de 2017, de UNQ: http://cronos.unq.edu.ar/ibcm/guiastp/2008/63a%a1ana/tp3_tm.pdf
- Vallenas, R., Alvarado, G., Barr3n, G., Perales, C. & Gavidia, C. (2013). Modelo de infecci3n experimental para la obtenci3n de *E. granulosus* adultos y quistes hidat3dicos secundarios en el h3mster dorado (*Mesocricetus auratus*). Revista de Investigaciones Veterinarias del Per3, 24(2), 233-239. Recuperado en 07 de noviembre de 2017, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172013000200014&lng=es&tlng=es.
- V3zquez, E. (2004). Las pruebas de ELISA. Laboratorio de Endocrinolog3a Instituto Nacional de Pediatr3a. Gac M3d M3x Vol. 140, Suplemento No. 3.
- Vizcaychipi, K., Sosa, S., Camicia, F., Santill3n, G., Casalins, M., Nigro, M. (2012). Hidatidosis retroperitoneal secundaria a quiste hidat3dico de localizaci3n

hepática. Departamento de Parasitología, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

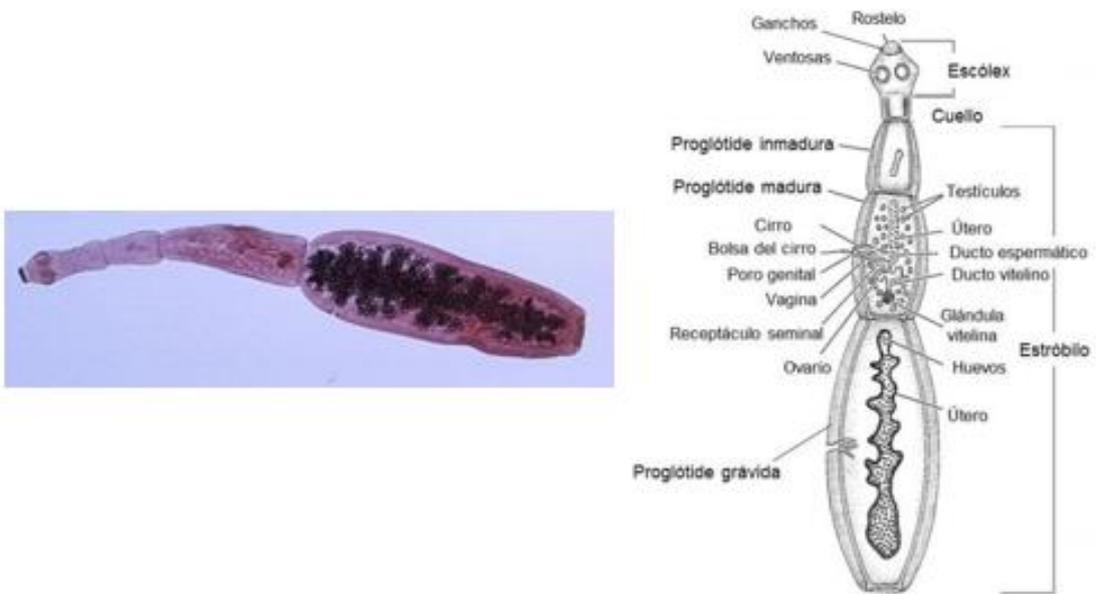
World Health Organization and World Organization for Animal Health, WHO & OIE. (2002). Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern. Institute of Parasitology, University of Zurich, Suiza.

Yábar, C. (2003). Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Serie de Normas Técnicas N o 38, 1–69. <https://doi.org/10.1024/0301-1526.32.1.54>

Anexos

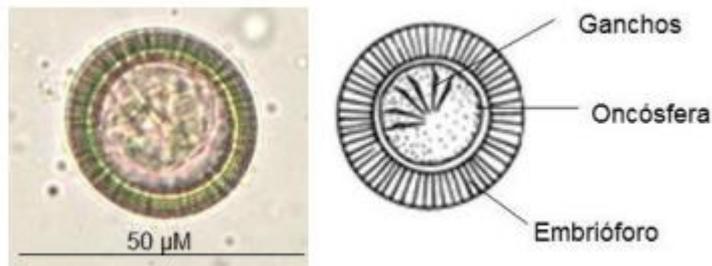
Anexo 1. Morfología estadio adulto y huevo del parásito *Echinococcus granulosus*.

Anexo 1a.



Nota: Tomado de (Silva, 2014) Caracterización estructural y funcional del Antígeno B de *Echinococcus granulosus*.

Anexo 1b.



Nota: Tomado de (Silva, 2014) Caracterización estructural y funcional del Antígeno B de *Echinococcus granulosus*.

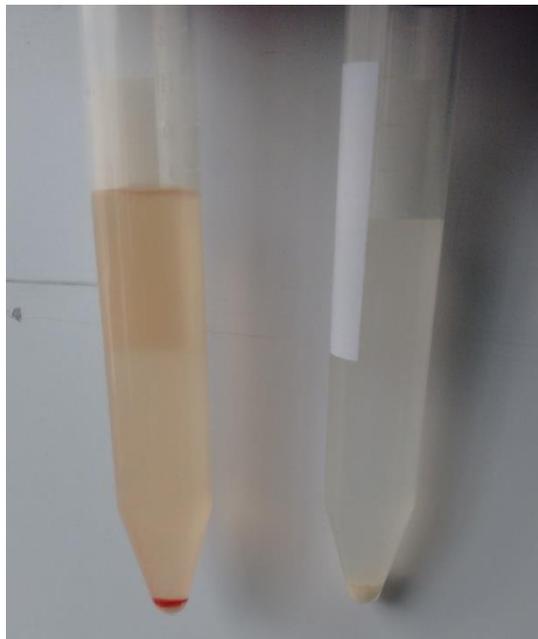
Anexo 2. Tratamiento de la muestra parasitaria, obtención y análisis del fluido hidatídico.

Anexo 2a.



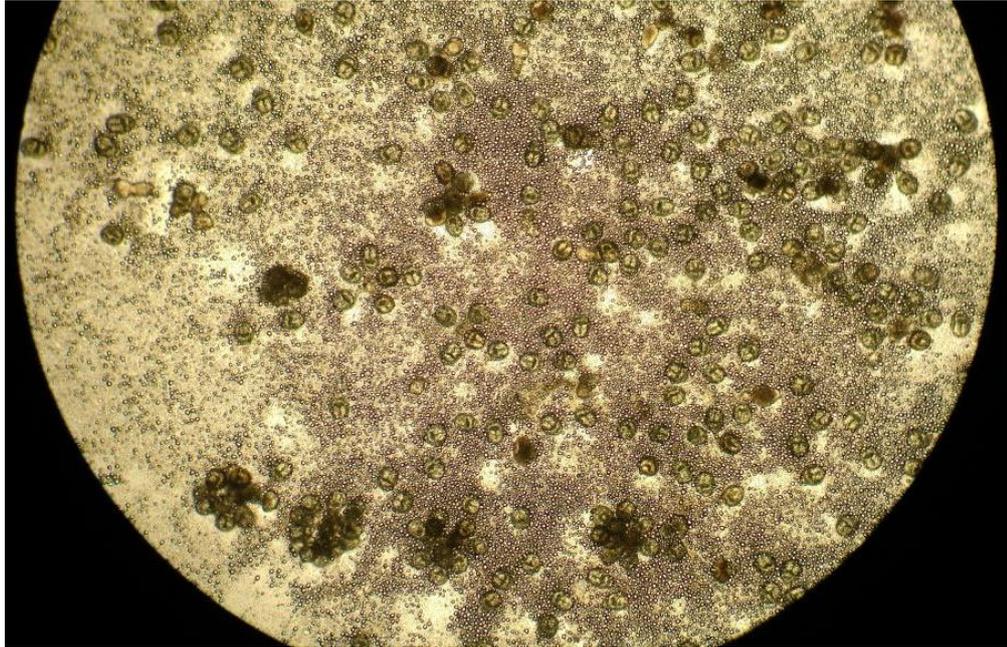
Nota: Capturado por el Autor, 2017.

Anexo 2b.



Nota: Capturado por el Autor, 2017.

Anexo 2c.



Nota: Capturado por el Autor, 2017.

Anexo 3. Kit QuantiPro BCA Assay Sigma Aldrich.



Nota: Capturado por el Autor, 2017.

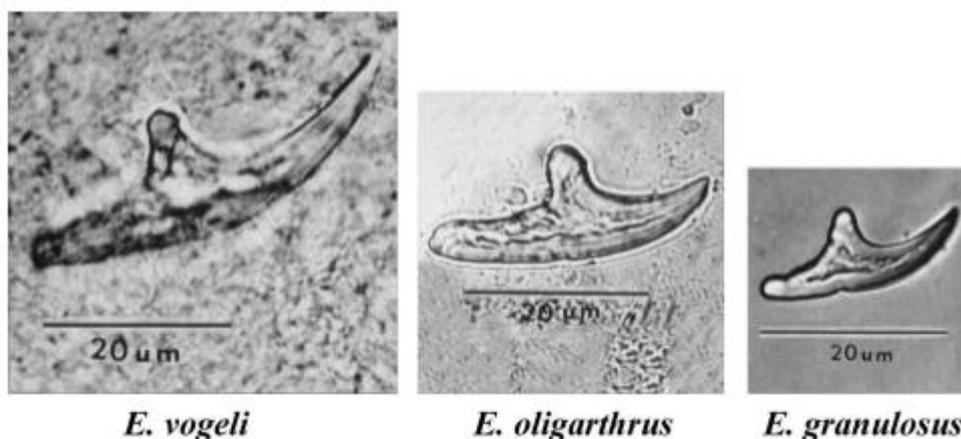
Anexo 4. Características morfométricas para la identificación de las especies del género *Echinococcus*.

Anexo 4a.

Character	<i>Echinococcus granulosus</i> (Batsch, 1786)	<i>E. multilocularis</i> Leuckart, 1863	<i>E. oligarthrus</i> (Diesing, 1863)	<i>E. vogeli</i> Rausch and Bernstein, 1972
Geographic distribution	Cosmopolitan	Central and northern Eurasia, northern North America	Central and South America	Central and South America
Host range				
Definitive hosts	Primarily dogs and other canids	Primarily foxes, also other canids and cats	Wild felids	Bush dog
Intermediate and aberrant hosts	Primarily ungulates, also marsupials and primates, humans	Primarily arvicolid rodents, also other small mammals, humans	Rodents; agoutis, paca, spiny rats, humans	Primarily agoutis, also other rodents, humans
Metacestode				
Nature of cyst	Unilocular, endogenous proliferation, no infiltration or metastasis	Multivesicular, endogenous proliferation, infiltration and metastasis	Polycystic, endogenous and exogenous proliferation, no infiltration or metastasis	Polycystic, endogenous and exogenous proliferation, no infiltration or metastasis
Location of cyst	Visceral, primarily liver and lungs	Visceral, primarily liver	Peripheral, primarily muscles	Visceral, primarily liver
Protoscolex				
Mean length (µm) of large hooks (range)	25.9-35.0 (19.4-44.0)	26.7-28.5 (25.0-29.7)	30.5-33.4 (29.1-37.9)	39.3-41.6 (38.2-45.6)
Mean length (µm) of small hooks (range)	22.6-27.8 (17.0-31.0)	23.1-25.4 (21.8-27.0)	25.4-27.3 (22.6-29.2)	32.5-34.0 (30.4-36.9)
Adult				
Mean length (µm) of large hooks (range)	32.0-42.0 (25.0-49.0)	31.0 (24.9-34.0)	52.0 (43.0-60.0)	53.0 (49.0-57.0)
Mean length (µm) of small hooks (range)	22.6-27.8 (17.0-31.0)	27.0 (20.4-31.0)	39.0 (28.0-45.0)	42.6 (30.0-47.0)
Mean number of segments (range)	3 (2-6)	4-5 (2-6)	3	3
Total length of strobila (mm)	2.0-7.0	1.2-4.5	2.2-2.9	3.9-5.6
Ratio of length of anterior part of strobila to length of gravid segment	1:0.86-1.30	1:0.31-0.80	1:0.96-1.10	1:2.2-3.1
Position of genital pore				
Mature segment	Near (usually posterior) to middle	Anterior to middle	Anterior to middle	Posterior to middle
Gravid segment	Posterior to middle	Anterior to middle	Near to middle	Posterior to middle
Mean number of testes (range)	32-68 (25-80)	18-26 (16-35)	29 (15-46)	56 (50-67)
Form of uterus	Lateral sacculations	Sac-like	Sac-like	Long, tubular and sac-like
Onset of egg production (days)	34-53	28-35	80?	?

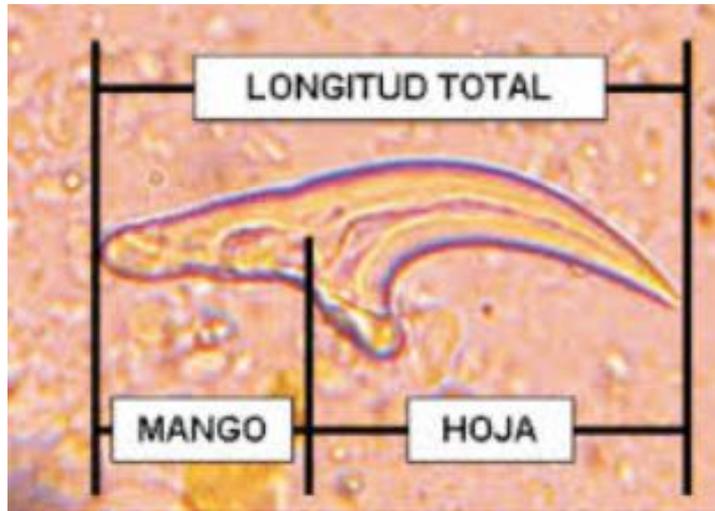
Nota: Tomado de (WHO & OIE, 2002) Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern.

Anexo 4b.



Nota: Tomado de (Kaminsky, 2003) Manual de Parasitología, Métodos para Laboratorios de Atención Primaria de Salud, 2da edición; (D'Alessandro & Rausch, 2008) New aspects of neotropical polycystic (*Echinococcus vogeli*) and unicystic (*Echinococcus oligarthrus*) echinococcosis.

Anexo 4c.



Nota: Tomado de (Vizcaychipi *et al.*, 2012) Hidatidosis retroperitoneal secundaria a quiste hidatídico de localización hepática.

Anexo 5. Equipo lavaplaclas Biotek Elx50 y lector BioTek ELx808 para microplacas ELISA.

Anexo 5a.



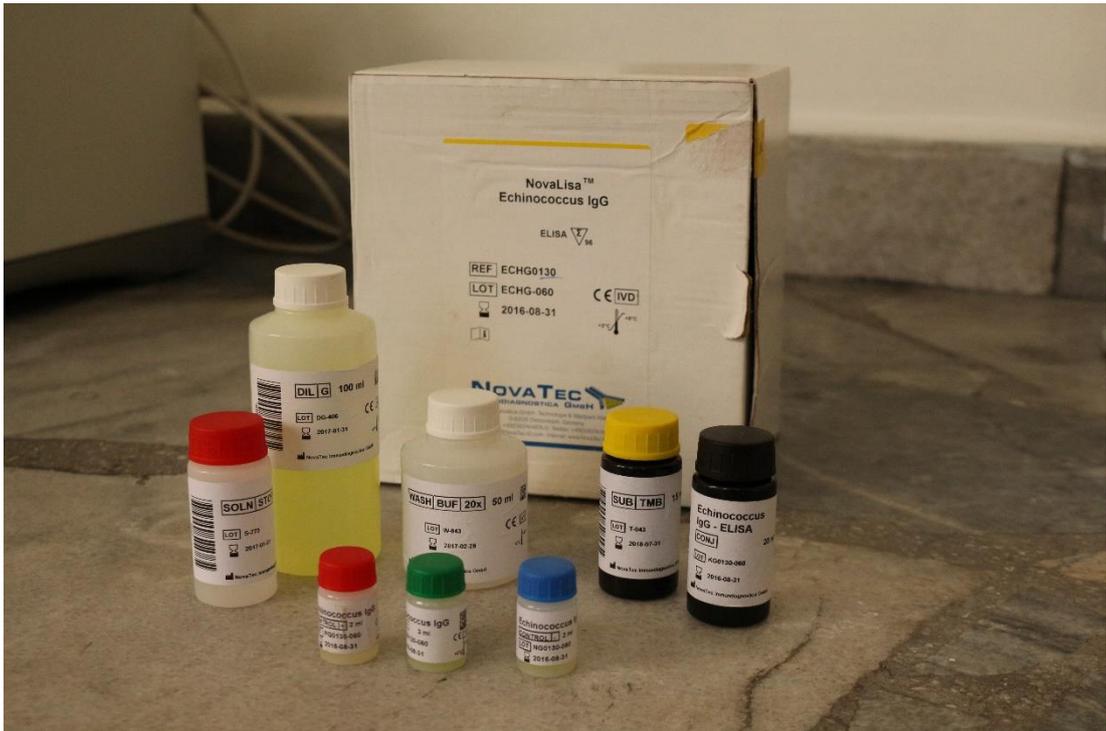
Nota: Capturado por el Autor, 2017.

Anexo 5b.



Nota: Capturado por el Autor, 2017.

Anexo 6. Kit Comercial NovaTec NovaLisa Echinococcus IgG ELISA.



Nota: Capturado por el Autor, 2017.

Anexo 7. Equipo Labnet Enduro VE10 Vertical Gel Electrophoresis System y termociclador convencional Eppendorf.

Anexo 7a.



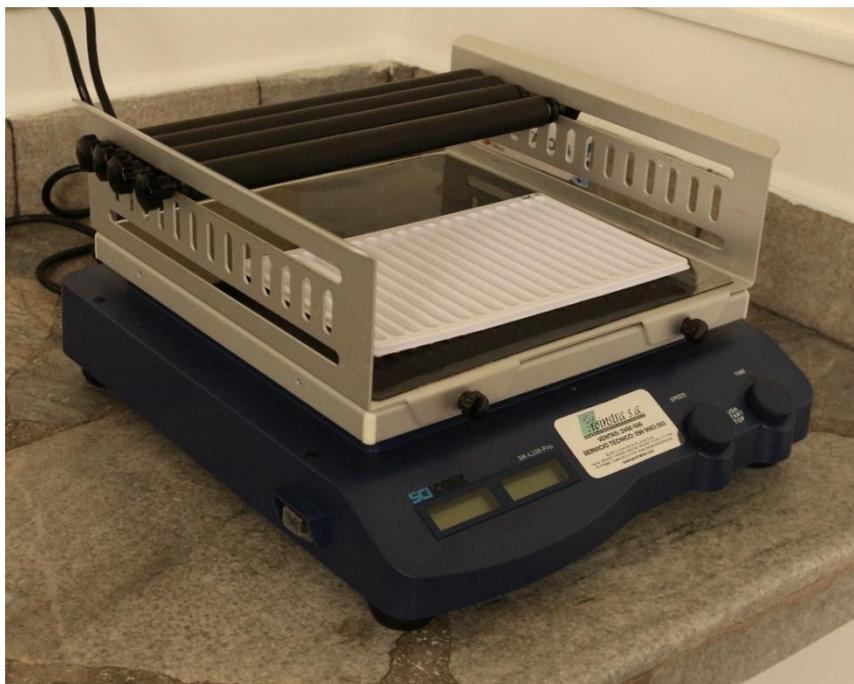
Nota: Capturado por el Autor, 2017.

Anexo 7b.



Nota: Capturado por el Autor, 2017.

Anexo 8. Agitador rotatorio SciLogex SK-L330-Pro.



Nota: Capturado por el Autor, 2017.

Anexo 9. Orden dispuesto para la distribución de blanco, controles y sueros problema. Resultados Placa 1 y 2 Prueba ELISA Indirecto casero.

Anexo 9a.

#1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco			Muestra 20			Muestra 44			Muestra 34		
B	C. Positivo			Muestra 35			Muestra 4			Muestra 6		
C	C. Negativo 1			Muestra 38			Muestra 52			Muestra 37		
D	C. Negativo 2			Muestra 25			Muestra 28			Muestra 30		
E	C. Negativo 3			Muestra 23			Muestra 49			Muestra 36		
F	Muestra 7			Muestra 21			Muestra 10			-		
G	Muestra 42			Muestra 27			Muestra 50			-		
H	Muestra 15			Muestra 51			Muestra 45			-		

Nota: Creado por el Autor, 2017.

Anexo 9b.

#2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco			Muestra 18			Muestra 11			Muestra 41		
B	C. Positivo			Muestra 33			Muestra 43			Muestra 40		
C	C. Negativo 1			Muestra 46			Muestra 47			Muestra 22		
D	C. Negativo 2			Muestra 31			Muestra 8			Muestra 26		
E	C. Negativo 3			Muestra 9			Muestra 5			Muestra 29		
F	Muestra 39			Muestra 13			Muestra 12			Muestra 24		
G	Muestra 16			Muestra 19			Muestra 14			-		
H	Muestra 48			Muestra 32			Muestra 17			-		

Nota: Creado por el Autor, 2017.

Anexo 9c.

Placa 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco			Muestra 20 (Negativo)			Muestra 44 (Indet.)			Muestra 34 (Positivo)		
	0.044	0.040	0.053	0.391	0.402	0.415	0.876	0.849	0.845	0.943	1.044	1.069
	0.046			0.403			0.857			1.019		
B	Control Positivo			Muestra 35 (Positivo)			Muestra 4 (Negativo)			Muestra 6 (Negativo)		
	1.837	1.677	1.686	0.972	0.967	0.974	0.713	0.734	0.712	0.270	0.336	0.357
	1.733			0.971			0.720			0.321		
C	Control Negativo 1			Muestra 38 (Positivo)			Muestra 52 (Indet.)			Muestra 37 (Positivo)		
	0.496	0.455	0.407	0.794	0.720	0.748	1.476	1.371	1.482	1.278	1.354	1.380
	0.453			0.754			1.443			1.337		
D	Control Negativo 2			Muestra 25 (Positivo)			Muestra 28 (Indet.)			Muestra 30 (Positivo)		
	0.685	0.592	0.723	1.023	0.934	0.937	0.365	0.333	0.334	1.555	1.541	1.631
	0.667			0.965			0.344			1.576		
E	Control Negativo 3			Muestra 23 (Indet.)			Muestra 49 (Negativo)			Muestra 36 (Indet.)		
	0.905	0.857	0.85	0.324	0.357	0.341	0.443	0.423	0.469	0.830	0.807	0.867
	0.871			0.341			0.445			0.835		
F	Muestra 7 (Negativo)			Muestra 21 (Negativo)			Muestra 10 (Negativo)					
	0.429	0.392	0.368	0.309	0.297	0.311	0.406	0.450	0.494			
	0.396			0.306			0.450					
G	Muestra 42 (Negativo)			Muestra 27 (Indet.)			Muestra 50 (Negativo)					
	0.532	0.502	0.481	0.451	0.447	0.417	0.332	0.403	0.365			
	0.505			0.438			0.367					
H	Muestra 15 (Negativo)			Muestra 51 (Negativo)			Muestra 45 (Negativo)					
	0.282	0.277	0.260	0.286	0.291	0.317	0.702	0.823	0.753			
	0.273			0.298			0.759					

Nota: Creado por el Autor, 2017.

Anexo 9d.

Placa 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco			Muestra 18 (Negativo)			Muestra 11 (Negativo)			Muestra 41 (Negativo)		
	0.041	0.038	0.041	0.284	0.313	0.296	0.606	0.613	0.613	0.307	0.338	0.373
	0.040			0.298			0.611			0.339		
B	Control Positivo			Muestra 33 (Indet.)			Muestra 43 (Negativo)			Muestra 40 (Negativo)		
	1.622	1.441	1.461	0.581	0.569	0.569	0.345	0.368	0.337	0.222	0.273	0.267
	1.508			0.573			0.350			0.254		
C	Control Negativo 1			Muestra 46 (Negativo)			Muestra 47 (Negativo)			Muestra 22 (Negativo)		
	0.434	0.398	0.426	0.332	0.313	0.322	0.209	0.205	0.215	0.293	0.312	0.326
	0.419			0.322			0.210			0.310		
D	Control Negativo 2			Muestra 31 (Positivo)			Muestra 8 (Negativo)			Muestra 26 (Indet.)		
	0.604	0.577	0.58	1.594	1.557	1.467	0.311	0.311	0.323	0.379	0.411	0.481
	0.587			1.539			0.315			0.424		
E	Control Negativo 3			Muestra 9 (Negativo)			Muestra 50 (Negativo)			Muestra 29 (Positivo)		
	0.824	0.788	0.781	0.326	0.314	0.296	0.291	0.304	0.321	1.207	1.229	1.397
	0.798			0.312			0.305			1.278		
F	Muestra 39 (Negativo)			Muestra 13 (Negativo)			Muestra 12 (Negativo)			Muestra 24 (Indet.)		
	0.469	0.394	0.401	0.321	0.295	0.303	0.238	0.263	0.270	0.403	0.447	0.461
	0.421			0.306			0.257			0.437		
G	Muestra 16 (Negativo)			Muestra 19 (Negativo)			Muestra 14 (Negativo)					
	0.271	0.250	0.241	0.375	0.386	0.346	0.404	0.408	0.406			
	0.254			0.369			0.406					
H	Muestra 48 (Negativo)			Muestra 32 (Positivo)			Muestra 17 (Negativo)					
	0.705	0.704	0.682	0.917	0.903	0.891	0.236	0.253	0.235			
	0.697			0.904			0.241					

Nota: Creado por el Autor, 2017.

Anexo 10. Distribución blanco, controles y suero problema en pocillos del Kit Comercial NovaTec NovaLisa Echinococcus IgG ELISA. Resultados evaluación.

Anexo 10a.

Kit	1	2	3	4	5	6
A	Blanco	Muestra 6	Muestra 30	Muestra 19	Muestra 42	Muestra 50
B	C. Negativo	Muestra 7	Muestra 14	Muestra 20	Muestra 43	Muestra 51
C	C. Cut off	Muestra 8	Muestra 15	Muestra 21	Muestra 35	Muestra 48
D	C. Cut off	Muestra 29	Muestra 16	Muestra 22	Muestra 45	Muestra 49
E	C. Positivo	Muestra 9	Muestra 17	Muestra 34	Muestra 46	Muestra 11
F	Muestra 25	Muestra 10	Muestra 18	Muestra 39	Muestra 47	-
G	Muestra 4	Muestra 12	Muestra 31	Muestra 40	Muestra 37	-
H	Muestra 5	Muestra 13	Muestra 32	Muestra 41	Muestra 38	-

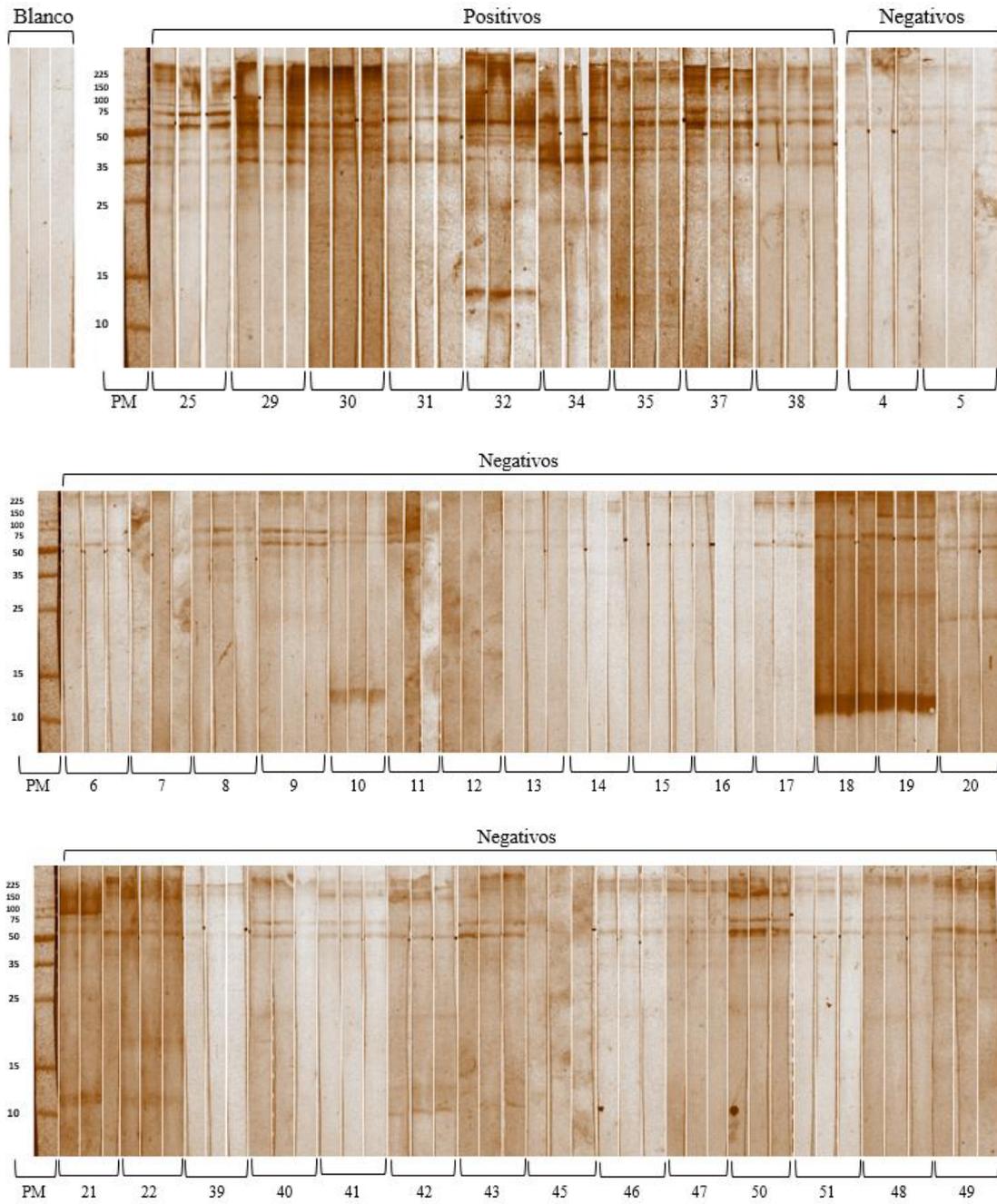
Nota: Creado por el Autor, 2017.

Anexo 10b.

Kit	1	2	3	4	5	6
A	Blanco	Muestra 6 (Negativo)	Muestra 30 (Positivo)	Muestra 19 (Negativo)	Muestra 42 (Negativo)	Muestra 50 (Negativo)
	0.032	0.171	0.602	0.186	0.054	0.166
B	C. Negativo	Muestra 7 (Negativo)	Muestra 14 (Negativo)	Muestra 20 (Negativo)	Muestra 43 (Negativo)	Muestra 51 (Negativo)
	0.020	0.175	0.121	0.202	0.130	0.139
C	C. Cut off	Muestra 8 (Negativo)	Muestra 15 (Negativo)	Muestra 21 (Negativo)	Muestra 35 (Positivo)	Muestra 48 (Negativo)
	0.228	0.129	0.153	0.149	0.407	0.079
D	C. Cut off	Muestra 29 (Positivo)	Muestra 16 (Negativo)	Muestra 22 (Negativo)	Muestra 45 (Negativo)	Muestra 49 (Negativo)
	0.231	0.742	0.175	0.115	0.196	0.177
E	C. Positivo	Muestra 9 (Negativo)	Muestra 17 (Negativo)	Muestra 34 (Positivo)	Muestra 46 (Negativo)	Muestra 11 (Negativo)
	0.471	0.160	0.171	0.686	0.115	0.150
F	Muestra 25 (Positivo)	Muestra 10 (Negativo)	Muestra 18 (Negativo)	Muestra 39 (Negativo)	Muestra 47 (Negativo)	-
	0.455	0.144	0.120	0.076	0.099	
G	Muestra 4 (Negativo)	Muestra 12 (Negativo)	Muestra 31 (Positivo)	Muestra 40 (Negativo)	Muestra 37 (Positivo)	-
	0.164	0.159	0.380	0.076	0.311	
H	Muestra 5 (Negativo)	Muestra 13 (Negativo)	Muestra 32 (Positivo)	Muestra 41 (Negativo)	Muestra 38 (Positivo)	-
	0.121	0.182	0.959	0.058	0.617	

Nota: Creado por el Autor, 2017.

Anexo 11. Tiras de nitrocelulosa tras la evaluación individual de sueros problema por InmunoBlot.



Nota: Elaborado por el Autor, 2017. BioRad Image Lab 5.0