

## Evaluación de la técnica Western blot para la detección de antígenos de *Hymenolepis nana*

### Evaluation of Western blot technique for detection of antigens of *Hymenolepis nana*

Flora Chávez-Salas, Olenka Vásquez, Hermes Escalante

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n, Trujillo, Perú.

Email Flora Chávez-Salas:  
fychs2003@yahoo.com

Email Olenka Vásquez:  
olenka2004@hotmail.com

#### Resumen

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la técnica de inmunoelectrotransferencia (Western Blot) para detectar los antígenos específicos de excreción/secreción de *Hymenolepis nana* en sueros de pacientes con himenolepiosis y con otras helmintiosis confirmadas. Se utilizó a *Mesocricetus auratus* "hamster" para obtener ejemplares adultos de *H. nana*. Los antígenos de excreción/secreción fueron obtenidos en el medio MEM (Minimum Essential Medium Eagle), y enfrentados con un grupo de sueros de pacientes con himenolepiosis confirmada para evaluar su calidad inmunológica y con sueros individuales de pacientes con himenolepiosis y con otras helmintiosis confirmadas para detectar mediante la técnica de "Western Blot", los antígenos específicos de este cestode. El grupo de sueros de pacientes con himenolepiosis confirmada reconoció las bandas antigénicas de 50,1; 42,6; 38,9; 32,9; 26,3; 22,4 y 18,6 kDa; sin embargo, los sueros individuales reconocieron diferente número de bandas, siendo la de 50,1 kDa la que fue reconocida por todos ellos. Los sueros de pacientes con helmintiosis confirmadas no reconocieron la banda de 50,1 kDa; sin embargo, dieron reacción cruzada con algunas de las demás bandas, a excepción de los sueros de pacientes con cisticercosis que no reconocieron a ninguna de las bandas de estos antígenos. Se concluye que el antígeno de excreción/secreción de *H. nana* de 50,1 kDa es específico de este cestode por ser reconocido por todos los sueros de pacientes con himenolepiosis confirmada y no por sueros de pacientes con otras helmintiosis utilizando la técnica de "Western Blot".

**Palabras clave:** *Hymenolepis nana*, Inmunoelectrotransferencia, Western blot, antígenos de excreción/secreción, himenolepiosis.

#### Abstract

Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay or "Western blot" was evaluated to detect specific excretory/secretory antigens from *Hymenolepis nana* using sera from patient with hymenolepiosis and other confirmed helminthiosis. *Hymenolepis nana* adults were obtained from experimentally infected golden hamster, the parasites were cultured in Minimum Essential Medium Eagle to get excretory/secretory antigens which were faced to a pool of sera from patients with confirmed hymenolepiosis to evaluate its immunological quality and with individual sera from patients with hymenolepiosis and other confirmed helminthiosis to detect by mean "Western blot" technique, this parasite specific antigens. The pool of sera from patients with confirmed hymenolepiosis recognized seven antigenic bands; 50,1; 42,6; 38,9; 26,3; 22,4; and 18,6 kDa; however, the individual sera recognized different number of bands being 50,1 kDa band the most recognized by all of them. The sera from patients with confirmed helminthiosis did not recognized 50,1 kDa band; however they gave cross reaction with some of the other bands, except the sera from patients with cisticercosis which did not recognized any of this antigen bands. Consequently 50,1 kDa antigen is specific because is recognized by all the sera from patients with confirmed hymenolepiosis and is not recognized by sera from patients with other helminthiosis using "Western blot" technique.

**Keywords:** *Hymenolepis nana*, immunoelectrotransfer blot, Western Blot, excretory/secretory antigens, hymenolepiosis.

Presentado: 06/09/2006  
Aceptado: 19/10/2007

#### Introducción

La himenolepiosis es una infección intestinal del hombre, las ratas y los ratones causada por cestodos del género *Hymenolepis*, siendo *Hymenolepis nana* o "tenia enana" la causante de la más frecuente de las cestodiasis humanas; esta parasitosis, habitualmente múltiple, afecta principalmente a niños, en quienes produce diversas manifestaciones clínicas con severa dificultad en el progreso ponderal (Atías, 1998).

La himenolepiosis, se encuentra con mayor frecuencia en países en vías de desarrollo, donde las condiciones socio-culturales y el nivel de saneamiento ambiental favorecen su propagación. En el Perú, la himenolepiosis es endémica y constituye un problema de salud pública, debido a las altas prevalencias que se presentan en muchas poblaciones rurales y suburbanas y por

sus efectos de interés en poblaciones mal nutridas (Rodríguez y Calderón, 1991).

Las formas adultas de *H. nana* son una fuente de numerosos y potentes antígenos que inducen las correspondientes respuestas inmunes por parte del sistema linfático del hospedero; algunos de estos antígenos forman parte de las estructuras morfológicas del parásito y han sido denominados antígenos somáticos o estructurales, otros antígenos son producto de la actividad fisiológica del parásito y se los ha denominado de excreción/secreción, un gran número de los cuales son generalmente enzimas o catabolitos generados por el parásito vivo y en pleno desarrollo (Barriga, 1981).

Cada vez se otorga mayor importancia a los antígenos de excreción/secreción, ya que entre ellos se encuentran los compu-

estos más específicos y las sustancias responsables de los fenómenos de protección del hospedero (Yarzabal, 1991). Por ello, se ha puesto mayor atención a estos antígenos, pues se ha comprobado que inducen una elevada respuesta inmune generándose, anticuerpos que poseen una especificidad tan precisa, capaz de distinguir entre diferentes cepas de una misma especie o entre distintos estadios evolutivos de un mismo parásito (Atías, 1998).

Para evaluar la inmunidad en las enfermedades parasitarias se emplean técnicas que se basan en la detección de antígenos específicos o de anticuerpos en diversos líquidos biológicos (Roitt et al., 1997). Una de las técnicas más importantes en el análisis y caracterización de fracciones antigénicas es la Electroinmunotransferencia (*Western Blot*), que básicamente es un proceso cualitativo que combina la selectividad de la electroforesis en gel de poliacrilamida, que permite fraccionar al antígeno, con la sensibilidad de la prueba inmunoenzimática, que pone en evidencia los complejos antígeno-anticuerpo formados (Garfín, 1990).

Querish et al., (1995) utilizando la técnica *Western Blot*, determinaron que el antígeno de 15 kDa es específico de *Fasciola hepatica* al emplear sueros de pacientes con fasciolosis; otros estudios han demostrado que los polipéptidos de 17, 23 y 28 kDa son específicos de este parásito (Díaz et al., 1998); en otra investigación se detectaron los antígenos de 43, 58, y 66 kDa como específicos de la larva de *Taenia solium* (Ko y Ng, 1995).

Nuestra investigación se realizó en consideración de que la himenolepiosis, en el Perú, es una parasitosis de elevada frecuencia en niños en edad pre-escolar y escolar, y que no se han efectuado investigaciones relacionadas con la caracterización de antígenos específicos de excreción/secreción de *H. nana*, los cuales podrían servir en estudios de inmunodiagnóstico o en la elaboración de vacunas.

En el presente trabajo se determina la eficacia de la técnica de Inmunolectrotransferencia o *Western Blot* en la detección de antígenos específicos de excreción/secreción de *H. nana* utilizando sueros de pacientes con himenolepiosis y con otras helmintiosis confirmadas.

## Material y métodos

### Sueros

Se obtuvieron 42 sueros de pacientes con parasitosis confirmada; de los cuales: 18 procedieron de alumnos del Centro Educativo Simón Bolívar de Otuzco, La Libertad; de estos sueros 12 procedieron de pacientes con himenolepiosis, cuatro con difilobotriosis y dos con ascariosis. Los 24 sueros restantes procedieron de la seroteca del Centro de Análisis e Investigación "Escalabs" E.I.R.L de Trujillo-Perú, de los cuales, siete eran de pacientes con cisticercosis, seis con hidatidosis, seis con taeniosis por *Taenia solium*, tres con taeniosis por *Taenia saginata* y dos de recién nacidos libres de infección por parásitos que sirvieron como control negativo.

### Antígenos

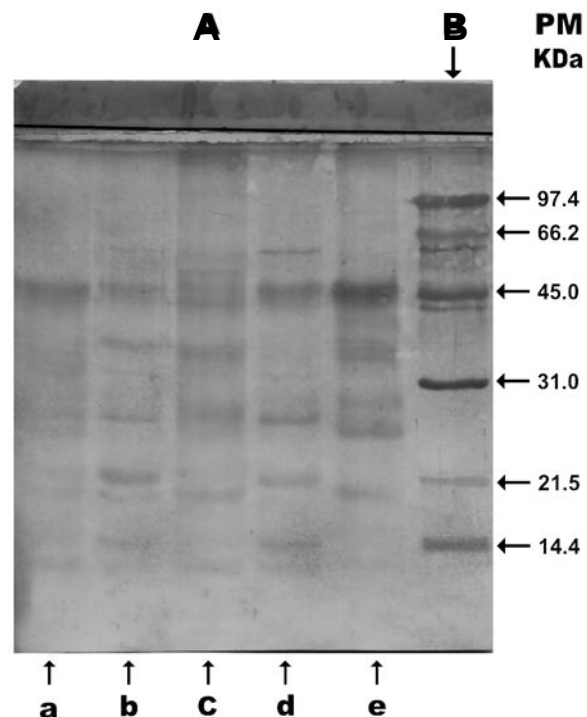
Para la obtención de los antígenos de *H. nana* se infectaron 30 ejemplares de *M. auratus* "hamster" vía oral con huevos viables de *H. nana* obtenidos de las heces de un grupo de niños con himenolepiosis confirmada. Los hamsters se sacrificaron a los 21 días para extraer los ejemplares adultos de este cestode, los que fueron cultivados asepticamente en el Medio Mínimo Esencial Eagles. El medio con los antígenos de excreción/secreción de *H.*

*nana* de cada cultivo se recolectó a las ocho, nueve, 14, 15 y 18 horas de incubación. La concentración de proteínas presentes en el medio con los antígenos se determinó por el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976).

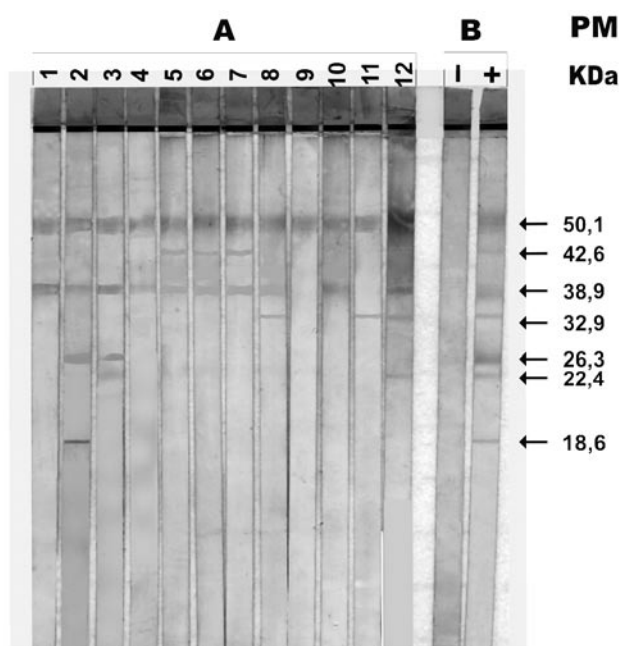
La preparación de los reactivos y la ejecución de la técnica se realizaron siguiendo el manual de Tsang (1986). Los antígenos se prepararon a la concentración de 0,025 µg/µl, para lo cual fueron tratados con 0,01 M de Tris-HCl a pH 8,0, 1% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 6% de glicerol y 0,01% de azul de bromofenol. Se calentó a 65 °C por 20 minutos.

Los antígenos de excreción/secreción fueron colocados en los pocillos en una cantidad equivalente a 1 µl por cada milímetro de ancho del gel. Los corridos fueron hechos en minigeles de 8x7x0,05 cm, 12% de poliacrilamida y 200V. La transferencia al papel de nitrocelulosa se hizo utilizando un buffer de transferencia (0,2 M Tris/HCl pH 8,0; 20% metanol y agua destilada) y a 1A por espacio de una hora. Las láminas de nitrocelulosa con los antígenos separados fueron cortadas en tiras de 3 mm de ancho.

Cada uno de los sueros fue enfrentado con los antígenos de excreción/secreción de *H. nana*; para lo cual cada uno de los sueros fueron diluidos a 1/60 en una solución de PBS Tween 20 y leche descremada al 5%, como bloqueador de las zonas ocupadas por los antígenos. El conjugado enzimático (Anti Ig G marcada con Peroxidasa) se usó por la dilución de 1/1000 siendo reveladas las bandas con solución de sustrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,01%) y la diaminobenzidina a la concentración de 0,5 mg/µl por 5 a 10 minutos.



**Figura 1.** Bandas de antígenos excreción/secreción de *Hymenolepis nana* detectadas por "Western blot", utilizando un grupo de sueros de pacientes con himenolepiosis confirmada. (A) Antígenos de excreción /secreción de *Hymenolepis nana* obtenidos de diferentes cultivos en Minimum Essential Medium Eagle a los tiempos de incubación de 8 (a), 9 (b), 14 (c), 15 (d) y 18 (e). (B) Marcador de peso molecular (PM) en Kilodaltons (kDa).



**Figura 2.** Bandas de los antígenos de excreción /secreción de *Hymenolepis nana* detectados por la técnica de "Western blot" utilizando sueros individuales de paciente con himenolepiosis confirmada. (A) sueros de pacientes con himenolepiosis confirmada. (B) Sueros controles.

### Resultados

El porcentaje de infección experimental de *Mesocricetus auratus* "hamster", por *Hymenolepis nana* fue de 67%, con un promedio de 40 ejemplares adultos de *H. nana* por hamster infectado, los cuales llegaron a medir entre uno y cinco centímetros de longitud.

La calidad inmunológica de los antígenos de excreción/secreción de *H. nana* obtenidos de diferentes cultivos en el medio MEM (Minimum Essential Medium Eagle) a las ocho, nueve, 14, 15 y 18 horas de incubación se evaluó enfrentándolos con un pool de 12 sueros de pacientes con himenolepiosis confirmada

mediante la técnica de *Western Blot* reconociéndose siete bandas antigénicas cuyos pesos moleculares fueron: 50,1; 42,6; 38,9; 32,9; 26,3; 22,4 y 18,6 kDa, siendo los antígenos obtenidos a las 18 horas, los que mostraron mayor nitidez (Fig. 1.)

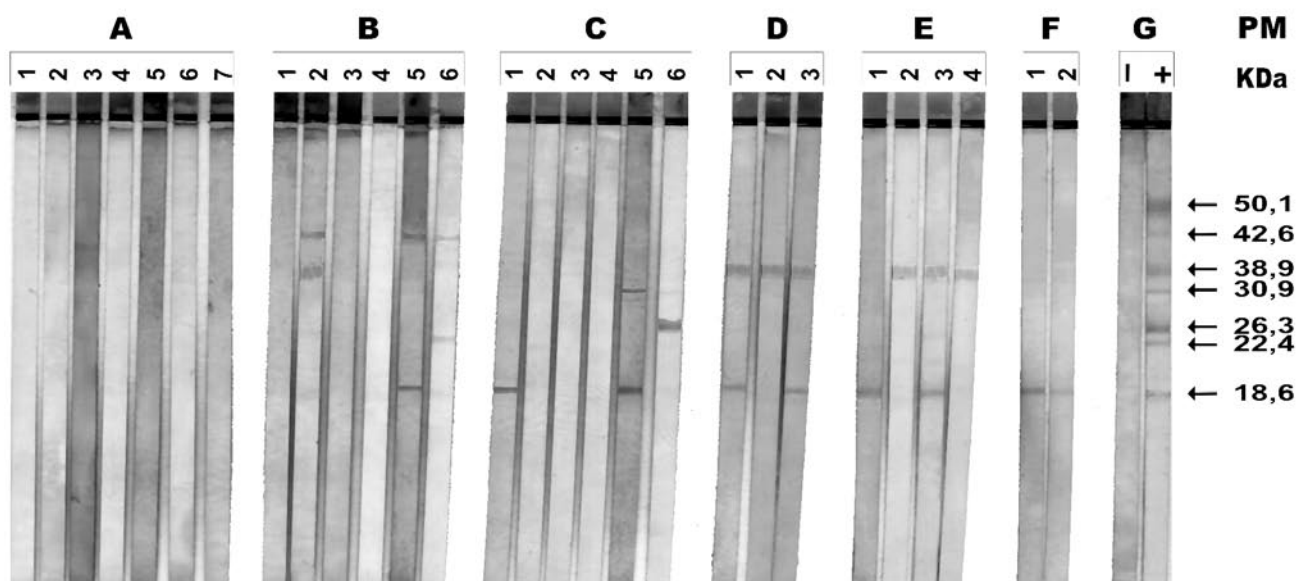
Los antígenos de *H. nana* obtenidos a las 18 horas de incubación en medio MEM Eagle, fueron enfrentados con 12 sueros individuales de pacientes con himenolepiosis confirmada, encontrando que cada suero reconoció diferente número de bandas antigénicas siendo la de 50,1 kDa, la que fue reconocida por todos ellos. (Fig. 2.).

Los antígenos específicos de excreción/secreción de *H. nana* obtenidos a las 18 horas de incubación en medio MEM Eagle, se evaluó utilizando sueros individuales de siete pacientes con cisticercosis, seis con hidatidosis, seis con taeniosis por *Taenia solium*, tres con taeniosis por *Taenia saginata*, cuatro con difilobotriosis y dos con ascariosis, encontrando que ninguno de los sueros de pacientes con estas parasitosis reconoció la banda de 50,1 kDa pero si dieron reacción cruzada con algunas de las demás bandas, a excepción de los sueros de pacientes con cisticercosis que no reconocieron a ninguna de las bandas de estos antígenos (Fig. 3).

### Discusion

Se logró el desarrollo de las formas adultas de *Hymenolepis nana* en hamster aún sin ser este su hospedero natural (Smyth, 1969; Barriga, 1981, Monroy, 1992). Esto fue posible con el empleo de acetato de metilprednisolona que inmunodeprimió a los animales y permitió la infección experimental, favoreciendo no sólo al establecimiento del parásito sino también al desarrollo del mismo, hasta alcanzar su forma adulta con producción de huevos.

Por otro lado el porcentaje de infección experimental de 67%, se debe probablemente, al hecho de que el hámster al no ser hospedero natural de *H. nana*, presenta condiciones físico-químicas en su tracto intestinal que no favorecen el establecimiento de este cestode. Además, la obtención de un promedio de 40 ejemplares del parásito por hámster infectado, cuyo número puede con-



**Figura 3.** Bandas de los antígenos de excreción /secreción de *Hymenolepis nana* detectados por la técnica de "Western blot" utilizando sueros individuales de paciente de pacientes parasitados por helmintos intestinales. (A) Con cisticercosis. (B) Con hidatidosis. (C) Con taeniosis por *Taenia solium*. (D) Con taeniosis por *Taenia saginata*. (E) Con difilobotriosis. (F) Con ascariosis. (G) Sueros controles.

siderarse no elevado, puede deberse a que el número de vermes varía en relación inversa al tamaño en el intestino delgado del hospedero (Maldonado, 1965).

La técnica de *Western Blot* tiene elevada sensibilidad, ya que detecta los complejos antígeno-anticuerpo mediante la técnica de Elisa y también elevada especificidad, debido a que fracciona los componentes proteínicos del antígeno. En el presente trabajo se optó por utilizar los antígenos en estado puro, por la baja concentración en que se encontraban, debido al pequeño tamaño de *H. nana* y la poca excreción de proteínas al medio MEM Eagle.

El empleo de los antígenos de excreción/secreción de *H. nana* obtenidos a las 18 horas de cultivo se debe a la mayor nitidez y menor número de bandas inespecíficas observadas en comparación con los antígenos obtenidos a las ocho, nueve, catorce y quince horas de cultivo. Esto podría atribuirse al número y tamaño de los ejemplares de *H. nana* cultivados por tubo así como a la calidad de los antígenos producidos por los mismos.

El número de bandas y sus respectivos pesos moleculares encontrados en el presente trabajo, no pueden ser comparados con otros trabajos por ser este el primero en su género con antígenos de excreción/secreción de *H. nana*.

El patrón de respuesta observado en cuanto al número de bandas e intensidad de la reacción indica que existe heterogeneidad de la respuesta inmunológica producida por los anticuerpos del hospedero contra el parásito (Vaz et. al., 1997; Larralde et. al., 1989)

La banda de 50,1 kDa, considerada como antígeno específico de *H. nana*, no mostró reacción cruzada con los anticuerpos de los sueros de pacientes con otras parasitosis, lo que indica que se trata de un producto metabólico propio de este parásito y que los anticuerpos formados contra los antígenos de excreción/secreción son capaces de distinguir entre los distintos estadios evolutivos de un mismo parásito y entre diferentes parásitos del mismo género familia y orden (Atías, 1998).

De los siete sueros confirmados a cisticercosis, ninguno reaccionó con las siete bandas antigénicas mencionadas, no encontrándose reacción cruzada con esta zoonosis, resultados que concuerdan con los obtenidos por Díaz et. al., (1992) quienes atribuyen la ausencia de reacción a la falta de anticuerpos contra *H. nana* en el suero de los pacientes. Díaz et. al., (1992) también explica que las reacciones cruzadas observadas entre los sueros de pacientes con otras helmintiasis intestinales y los antígenos de *H. nana*, se deben a la proximidad filogenética entre estos parásitos. La existencia de reacciones cruzadas indicaría también que estos parásitos presentan algunos componentes antigénicos comunes con *H. nana* que dan lugar a estas reacciones.

La reacción positiva observada en la banda de 18,6 kDa del antígeno de excreción/secreción de *H. nana* con los sueros de pacientes con ascariosis, probablemente no se deba a una reacción cruzada, sino a que estos pacientes, además de presentar ascariosis quizás hayan presentado himenolepiosis por proceder de una zona endémica.

## Literatura citada

- Atías, A. 1998. Parasitología Clínica. 3ra Ed. Editorial Mediterráneo. Santiago - Chile.
- Barriga, O. 1981. The Immunology of Parasitic Infections. A handbook for physicians, veterinarians and biologists. University Park Press. Baltimore, Maryland.
- Bradford, M. 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Díaz, J.; M. Verastegui; R. Gilman; C. Victor; J. Tsang; B. Joy; C. Pilcher; C. Gallo; H. García; P. Torres; T. Montenegro; E. Miranda & the cysticercosis working group in Peru. 1992. Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*): A field comparison of an antibody-enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa), Immunoelctrotransfer Blot (EITB) assay in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46(5): 610-15.
- Díaz, A.; O. Li Elías; O. Otero. Otero; C. García & A. Espino. 1998. Identificación mediante Western Blot de inmunógenos de *Fasciola Hepática* reconocidos por los sueros de ratas infectadas experimentalmente. *Rev. Cubana de Med. Trop.* 50(1):12.
- Garfin, D. 1990. Isoelectric focusing. *Methods Enzymol* 182:459-477
- Larralde, C.; R. Montoya; E. Sciutto.; M. Díaz; T. Govezensky & E. Coltorti, 1989. Deciphering Western Blot of tapeworms antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am. J. Trop. Hyg.* 40: 282-90.
- Ko, R & T. Ng. 1998. Evaluation of excretory/secretory products of larval *Taenia solium* as diagnostic antigens for porcine and human cisticercosis. University of Hong Kong. China. *Journal of Helminthology*. 72(2): 147-154.
- Maldonado, J. 1965. Helmintiasis del hombre en América. Editorial Científico Médica. Barcelona. España.
- Monroy, A.; J. Gómez; A. Ramírez & G. Carrillo. 1992. Reconocimiento por inmunotransferencia de antígenos de *Taenia solium* y su larva. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 34: 33-38.
- Qureshi, T.; G. Wagner; D. Drawe; D. Davis. & T. Craig. 1996. Enzyme-linked immunotransfer blot análisis of excretory-secretory proteins of *Fascioloides magna* and *Fasciola hepática*. *Vet Parasitol.* 58(4): 357
- Rodríguez, J. & J. Calderón. 1991. Parasitismo intestinal en niños en edad pre-escolar de Tarapoto. *Revista de Gastroenterología del Perú*. 11(3):153-60
- Roitt A; Brostoff J. & Male, D. 1997. Inmunología. 4ta. ed. Edit. Harcourt-Brace. Madrid-España
- Smyth, J. 1969. The Physiology of the Cestodes. Constable LTD. Hopctoun Street, Edinmburgh 7.
- Tsang, V. 1986. Enzyme Linked Immunotransfer Blot technique (Western Blot) for human T Lynphotopic Virus type III/Lynphoadenopathy-associated Virus (Htlv/LAV) Antibodies. US Department of Health and Human services. Public Health Service Centers for Disease Control. Atlanta. Immunology series N° 15. Procedural guide.
- Vaz, A.; C. Nunes; R. Piazza; J. Livramento; M. Da Silva & P. Nakamura. 1997. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am. J. Trop Med. Hyg.* 57: 354-7
- Yarzabal, L. 1991. Aspectos inmunológicos de las enfermedades parasitarias. *Inmunología Clínica*. Venezuela. 2:7-21.