

# Avances recientes en el inmunodiagnóstico de la hidatidosis humana

David Carmena<sup>a</sup>, Aitziber Benito<sup>b</sup> y Elena Eraso<sup>b</sup>

<sup>a</sup>MRC Clinical Sciences Centre, Membrane Transport Biology Group, Faculty of Medicine, Imperial College, Hammersmith Hospital Campus, London.

<sup>b</sup>Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco, Vitoria, España.

La hidatidosis humana es una grave zoonosis parasitaria causada por el estadio larvario del cestodo *Echinococcus granulosus*. La infección puede tener consecuencias fatales si no es tratada adecuadamente, por lo que el diagnóstico temprano de la infección es esencial. Actualmente las técnicas serodiagnósticas más fiables son el análisis inmunoenzimático (ELISA) y el *immunoblotting*, cuya precisión es en gran medida dependiente de la calidad de la fuente antigénica usada. El líquido hidatídico ha sido el extracto antigénico tradicionalmente utilizado en la serología de la enfermedad, basada en la detección de los antígenos B y 5. Sin embargo, problemas asociados a su estandarización y falta de sensibilidad y especificidad limitan su utilidad diagnóstica. En esta revisión se recogen las novedades más recientes en la identificación y caracterización de antígenos con potencial para el inmunodiagnóstico de la hidatidosis humana, con especial mención a los nuevos antígenos recombinantes y péptidos sintéticos. También se discuten importantes avances como el creciente uso de extractos antigénicos procedentes de otros estadios de desarrollo del parásito, así como la utilidad de la determinación del patrón de citocinas en el seguimiento de la evolución de la infección en pacientes tras tratamiento quirúrgico o farmacológico.

**Palabras clave:** *Echinococcus granulosus*. Hidatidosis humana. Inmunodiagnóstico.

Recent advances in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis

**Human cystic echinococcosis is a severe zoonotic infection caused by the larval stage of the taeniid tapeworm *Echinococcus granulosus*. The infection may be fatal if proper treatment is not provided; hence, early diagnosis is very important. Currently, ELISA and immunoblotting are the most reliable tests for serodiagnostic purposes,**

although their accuracy is largely dependent on the quality of the antigenic source used. Hydatid cyst fluid has been the antigenic extract of choice for primary immunodiagnosis of the disease, which is mainly based on the detection of antigens B and 5. Several problems are associated with this extract, however, including a lack of sensitivity and specificity, and difficulties with standardization of its use. This paper reviews recent advances in the identification and characterization of novel antigens that may be useful for the immunodiagnosing of human cystic echinococcosis, with emphasis on progress in recombinant technologies and synthetic peptides. Novel approaches are discussed, such as the design of antigenic extracts from other developmental stages of the parasite, as well as the usefulness of serum cytokine detection in the clinical follow-up of affected patients after surgical or pharmacological treatment.

**Key words:** *Echinococcus granulosus*. Human cystic echinococcosis. Immunodiagnosis.

## Introducción

La hidatidosis humana es una zoonosis parasitaria causada por el estadio larvario del cestodo *Echinococcus granulosus* (familia Taeniidae). La enfermedad tiene una distribución mundial, con elevadas prevalencias en los países del área mediterránea, norte y este de África, China, Suramérica y Australia<sup>1,2</sup>. En España la incidencia de la hidatidosis humana tiende a disminuir, desde una tasa de 2,52 casos/100.000 habitantes en 1985 hasta una tasa de 1,01/100.000 habitantes en 1996<sup>3</sup>, último año en el que la hidatidosis se consideró una enfermedad de declaración obligatoria. Esta tendencia se debe principalmente a la implantación y mantenimiento de programas de control de la enfermedad<sup>4</sup>. Actualmente Aragón, Castilla y León, La Rioja y Navarra son las Comunidades Autónomas que presentan mayores incidencias, con tasas comprendidas entre 1,62-4 casos/100.000 habitantes<sup>3-5</sup>. En nuestro entorno, la enfermedad se transmite a través de un ciclo doméstico mantenido entre perros (hospedador definitivo) y ungulados domésticos (principalmente ovinos y vacunos) como hospedadores intermediarios. El hombre adquiere la infección tras ingerir de forma accidental alimentos o agua contaminados con los huevos del parásito. Una vez en el intestino, el huevo eclosiona y libera el embrión hexacanto u oncosfera, que atraviesa la lámina propia y es transportada por

Correspondencia: Dr. D. Carmena.  
MRC Clinical Sciences Centre, Membrane Transport Biology Group,  
Faculty of Medicine, Imperial College, Hammersmith Hospital Campus,  
Du Cane Road, London W12 0NN, UK.  
Correo electrónico: d.carmena@imperial.ac.uk

Manuscrito recibido el 16-11-2005; aceptado el 5-6-2006.

los vasos sanguíneos hasta alcanzar diversos órganos o tejidos. Tras establecerse en ellos, la oncosfera da origen al estadio larvario, también denominado metacestodo o quiste hidatídico, que se desarrolla como una vesícula unilocular rellena de líquido. En el hombre el hígado es el órgano más frecuentemente afectado (52-73%), seguido de los pulmones<sup>6</sup> (10-40%). Habitualmente la infección permanece asintomática durante años, hasta que la aparición de complicaciones (rotura del quiste, infección, compresión mecánica de órganos adyacentes) desencadena la sintomatología de la enfermedad, que puede variar en función del órgano afectado, el número y tamaño de los quistes y el tipo de complicaciones que afecten a los mismos.

Actualmente, el diagnóstico de la hidatidosis humana está basado en la combinación de métodos de tratamiento de imagen (ecografía, tomografía computarizada, resonancia magnética, rayos X) y ensayos inmunodiagnósticos (principalmente análisis inmunoenzimático [ELISA] e *immunoblotting*), estos últimos habitualmente utilizados como técnicas de confirmación de los casos sospechosos<sup>7</sup>.

La eficacia de las técnicas empleadas en el serodiagnóstico de la enfermedad es en gran medida dependiente de una serie de factores como el origen, pureza y calidad del extracto antigénico utilizado<sup>8,9</sup>, el panel de sueros seleccionado (sueros de pacientes confirmados o no quirúrgicamente, subclase de las inmunoglobulinas)<sup>9,10</sup>, el órgano afectado y el número de quistes<sup>11</sup>. El líquido hidatídico es la principal fuente antigénica empleada tanto para el inmunodiagnóstico primario como para el seguimiento de pacientes después de tratamiento quirúrgico o farmacológico<sup>12</sup>. Sin embargo, este extracto ha evidenciado problemas tanto en la estandarización de su uso como en su falta de sensibilidad y especificidad<sup>13,14</sup>. Así, un elevado porcentaje de pacientes con hidatidosis confirmadas clínica o quirúrgicamente muestran serología negativa (falsos negativos), mientras que problemas de reactividad cruzada son frecuentemente hallados con sueros de pacientes infectados con otros helmintos, principalmente *E. multilocularis* y *Taenia solium*<sup>15,16</sup>. Para paliar estos inconvenientes, en los últimos años se ha realizado un considerable esfuerzo con el fin de identificar nuevos componentes altamente inmunogénicos derivados de otros estadios de desarrollo del parásito. Así, los extractos somáticos y los productos de excreción-secreción de protoescolex y adultos han sido caracterizados y ensayados, evaluándose su potencial en el serodiagnóstico de la hidatidosis humana.

La utilización de técnicas de biología molecular ha permitido también disponer de una considerable gama de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos cuyo uso, de forma individual o conjunta, ha supuesto una considerable mejora en las prestaciones diagnósticas de las técnicas disponibles<sup>17</sup>. Sin embargo, a pesar de todos estos avances no existe actualmente una técnica estandarizada que aúne elevadas sensibilidad y especificidad diagnósticas<sup>18</sup>.

## Antígenos del líquido hidatídico (LH)

El LH está constituido por una compleja mezcla de glucoproteínas y lipoproteínas, hidratos de carbono y sales minerales. Algunos de sus componentes provienen del hospedador (principalmente albúmina e inmunoglobulinas), mientras que el resto son producto de la actividad metabólica del metacestodo. Históricamente, el LH es la fuente de

antígenos más importante para el inmunodiagnóstico de la hidatidosis humana. Con fines clínicos, el LH bruto posee una sensibilidad en torno al 85-95%, aunque su especificidad está frecuentemente limitada por problemas de reactividad cruzada con sueros de pacientes infectados con otros cestodos, nematodos y trematodos<sup>7,15,16</sup>, especialmente con *E. multilocularis* y *T. solium*. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que en España la hidatidosis alveolar no es una enfermedad autóctona, mientras que la prevalencia de la cisticercosis es baja<sup>19</sup>. Por estos motivos el serodiagnóstico basado en el uso de LH bruto presenta menos inconvenientes que en otras regiones del mundo donde estas enfermedades son endémicas. Otro factor que hay que considerar es el tipo de órgano afectado, puesto que la localización del quiste puede ser una importante causa de falsos negativos. Así, entre el 10-20% de los pacientes con quistes hepáticos y aproximadamente el 40% de los pacientes con quistes pulmonares no presentan niveles significativos de anticuerpos (IgG) específicos<sup>11,20</sup>.

Del mismo modo, quistes alojados en riñón, bazo, cerebro o hueso inducen una baja o nula respuesta de anticuerpos contra el parásito<sup>20</sup>. Por todos los motivos expuestos, actualmente el LH bruto está especialmente recomendado en estudios seroepidemiológicos<sup>21</sup>, mientras que el diagnóstico individual se basa en el uso de fracciones purificadas como las lipoproteínas antígeno B y antígeno 5. El rendimiento del LH en el inmunodiagnóstico de la hidatidosis humana se especifica en la tabla 1.

## Antígeno B (AgB)

El AgB<sup>22</sup> es una proteína polimérica de 120-160 kDa que en condiciones reductoras se disocia en subunidades de 8/12, 16 y 20/24 kDa. Este hecho sugiere que su arquitectura está constituida por agregados multiméricos de la subunidad de 8 kDa<sup>23</sup>. El papel que desempeña el AgB en la fisiología del parásito no está plenamente establecido, pero hay evidencias que demuestran su participación en la evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador<sup>16,24</sup>. La identificación mediante *immunoblotting* de la subunidad de 8/12 kDa es actualmente considerada el método de mayor especificidad para el diagnóstico de la enfermedad<sup>25</sup>. Sin embargo, el 18% de los sueros de pacientes con hidatidosis no presentan niveles detectables de anticuerpos específicos, mientras que el 39% de los sueros de pacientes con hidatidosis alveolar muestran reactividad cruzada con la subunidad de 8/12 kDa<sup>26</sup>. Por otra parte, el seguimiento de los niveles de IgE específica contra el AgB ha demostrado ser una importante herramienta para determinar la evolución de la infección en pacientes después de tratamiento quirúrgico o farmacológico<sup>12</sup>.

Recientes estudios moleculares han demostrado que el AgB está codificado por una familia multigénica de expresión variable constituida por al menos 5 isoformas, denominadas *EgAgB1* a *EgAgB5*<sup>27</sup>. Hasta el momento sólo *EgAgB1* y *EgAgB2* han sido clonados y usados con fines inmunodiagnósticos. De ellos, *EgAgB2* ha mostrado la mejor eficacia diagnóstica, sensiblemente superior a la del AgB nativo<sup>9</sup>. Es de destacar que la subclase IgG4 es predominante en la respuesta mostrada por sueros de pacientes con hidatidosis frente al AgB tanto nativo como recombinante, sugiriendo que ésta puede ser la subclase de elección en ensayos serológicos<sup>9,28</sup>.

TABLA 1. Características principales de los ensayos para el serodiagnóstico de la hidatidosis humana basada en el uso del antígeno de líquido hidatídico

Antígeno	N° de sujetos estudiados			Ensayo	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Reactividad cruzada	Referencia
	Pacientes con hidatidosis	Pacientes con otras enfermedades	Sujetos sanos					
LHfe	204**	53	90	IEF	31	100	Ninguna	25
LHfp	119*	54	37	AL	86	88	HA, Cis., Tox., Fil.	60
LHfe	204**	53	90	HI	54	100	Ninguna	25
LH	87*	339	200	ELISA IgG	94	82	HA, Esq., Fas., Tri., Asc., Neo.	8
LH	90*	88	28	ELISA IgG	84	60	HA	29
LHfp	119*	54	37	ELISA IgG	83	87	HA, Cis., Tri., Fil.	60
LHfe	204**	53	90	ELISA IgG	72	97	Cis., Esq., QS	25
LHfe	204**	53	90	IB IgE	80	96	Cis., QS	25
LH	129*,**	65	203	ELISA IgG	78	97	Cis., Tox.	9
LH	59*	55	15	ELISA IgG	79	73	HA, Cis.	61

\*Sueros de pacientes con hidatidosis confirmada quirúrgicamente.

\*\*Sueros de pacientes con hidatidosis confirmada mediante pruebas serológicas o técnicas de imagen.

LH: líquido hidatídico; fe: fracción enriquecida; fp: fracción purificada; IEF: inmunoelectroforesis; AL: aglutinación de látex; HI: hemaglutinación indirecta; IgG: inmunoglobulina G; ELISA: análisis inmunoenzimático; IB: *immunoblotting*; Asc.: ascariasis; Cis.: cisticercosis; Esq.: esquistosomiasis; Fas.: fasciolosis; Fil.: filariosis; HA: hidatidosis alveolar; Neo.: neoplasma; Onc.: oncocercosis; QS: quiste seroso; Tox.: toxocariasis; Tri.: triquinosis.

Con el fin de determinar con más precisión los epitopos del AgB involucrados en fenómenos de inmunogenicidad, otros estudios han tenido por objeto la evaluación diagnóstica de péptidos sintéticos que incorporan estas secuencias<sup>29,30</sup>. Sin embargo, hasta el momento actual tan sólo el péptido p176 ha revelado características diagnósticas relevantes<sup>30</sup>. En estos trabajos se ha demostrado también que la combinación de antígenos con secuencias bien definidas, incluyendo péptidos sintéticos, puede mejorar la especificidad del inmunoensayo al reducir el número de falsos negativos<sup>29</sup>. El rendimiento del AgB (nativo y recombinante) y de los péptidos sintéticos derivados de esta molécula en el inmunodiagnóstico de la hidatidosis humana se especifican en la tabla 2.

## Antígeno 5 (Ag5)

El Ag5<sup>31</sup> es una proteína termolábil constituida por dos componentes de 57 y 67 kDa<sup>32</sup> que en condiciones reductoras se disocian en subunidades de 38 y 22-24 kDa<sup>23</sup>. La función de esta molécula en la biología del parásito es casi completamente desconocida, aunque su elevada concentración en el LH sugiere un papel destacado en el desarrollo del metacestodo. Recientemente se ha demostrado que la subunidad de 38 kDa está íntimamente relacionada con serina-proteasas de la familia de la tripsina, mientras que la subunidad de 22 kDa parece estar implicada en fenómenos de adhesión a la matriz extracelular<sup>33</sup>. Al igual que en el caso del AgB, también se han detectado diferentes isoformas del Ag5, por lo que esta molécula parece estar codificada por una familia multigénica de expresión variable<sup>34</sup>.

El Ag5 ha sido ampliamente utilizado en el serodiagnóstico de la hidatidosis humana, principalmente mediante la detección del arco 5 en inmunolectroforesis. Sin embargo, entre el 10-40% de los sueros de pacientes con hidatidosis quirúrgicamente confirmadas no presentan niveles detectables de anticuerpos específicos contra este antígeno en

ELISA<sup>35</sup>. Además, el Ag5 ha demostrado diversos grados de reactividad cruzada con sueros de pacientes infectados con otros helmintos. Este problema es en parte debido a la presencia del hapteno fosforilcolina en la subunidad de 38 kDa<sup>23,36</sup>. La fosforilcolina es un componente estructural compartido por múltiples especies, tanto procariotas como eucariotas, que además presenta propiedades inmunorreguladoras en nematodos<sup>37</sup>. Estudios recientes mediante ELISA han revelado que el Ag5 posee una sensibilidad y especificidad diagnóstica del 50-54 y 89-92%, respectivamente<sup>29,38</sup>. Estos resultados demuestran que el Ag5 es menos útil que el AgB en el serodiagnóstico de la hidatidosis humana.

Aunque la secuencia completa del Ag5 ha sido clonada recientemente<sup>33</sup>, la proteína recombinante no ha sido aún evaluada en ensayos inmunodiagnósticos. Sin embargo, un péptido sintético derivado de este antígeno (péptido 89-122) ha sido empleado en diversos estudios, con resultados variables en función del grupo de sueros ensayado<sup>29,38,39</sup>. El rendimiento del Ag5 nativo y de los péptidos sintéticos derivados de esta molécula en el inmunodiagnóstico de la hidatidosis humana se especifican en la tabla 3.

La estandarización del serodiagnóstico de la hidatidosis humana también ha sido mejorada mediante la producción y uso de anticuerpos monoclonales, principalmente dirigidos contra el AgB y el Ag5 (revisado por Siles-Lucas y Gottstein<sup>40</sup>).

## Antígenos somáticos de protoescoléx y adultos

En los últimos años la búsqueda de nuevos componentes con relevancia en el serodiagnóstico de la hidatidosis humana ha conllevado la obtención y uso de extractos derivados de otras fuentes antigénicas, como protoescoléx y adultos. Aunque los extractos somáticos brutos han evidenciado pobres especificidades en ELISA<sup>41</sup>, varias proteí-

TABLA 2. Características principales de los ensayos para el serodiagnóstico de la hidatidosis humana basada en el uso del AgB (nativo y recombinante) y de los péptidos sintéticos derivados de esta molécula

Antígeno	Nº de sujetos estudiados			Ensayo	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Reactividad cruzada	Referencia
	Pacientes con hidatidosis	Pacientes con otras enfermedades	Sujetos sanos					
AgB nativo	210*,**	79	47	ELISA IgG4	63	81	HA, Cis., Esq.	28
AgB nativo	90*	88	28	ELISA IgG	77	86	HA	29
AgB nativo	90*	86	28	ELISA IgG	77	86	HA	30
AgB nativo	204**	53	90	ELISA IgG	73	100	Ninguna	25
AgB nativo	31*,**	87	29	ELISA IgG	77	82	HA, Esq., Tox.	62
AgB nativo	129*,**	65	203	ELISA IgG	60	93	Cis., Tox.	9
AgB nativo	59*	55	15	ELISA IgG	80	77	HA, Cis.	61
AgB nativo	173*,**	181	29	IB IgG	92	71	HA	63
AgB nativo	87*	339	200	IB IgG	60-71	98	HA, Cis.	8
AgB nativo	204**	53	90	IB IgG	73	100	Ninguna	25
rAgB8/1	210*,**	79	47	ELISA IgG4	65	91	HA	28
rAgB8/1	31*,**	87	29	ELISA IgG	55	80	HA, Esq., Tox.	62
rAgB8/1	129*,**	65	203	ELISA IgG	84	91	Cis.	9
rAgB8/1	59*	55	15	ELISA IgG	68	88	HA, Cis.	61
rAgB8/1	204**	53	90	IB IgG	72	100	Ninguna	25
rAgB8/2	31*,**	87	29	ELISA IgG	84	98	Esq., Tox.	62
rAgB8/2	129*,**	65	203	ELISA IgG	93	99	Cis., Tox.	9
rAgB8/2	59*	55	15	ELISA IgG	45	86	HA, Cis.	61
p65	90*	88	28	ELISA IgG	34-48	80-97	HA, Onc., Esq.	29
p65	90*	86	28	ELISA IgG	44	96	HA, Esq., Tox.	30
p175	90*	86	28	ELISA IgG	49	94	HA, Esq., Tox.	30
p176	90*	86	28	ELISA IgG	80	93	HA, Esq., Tox.	30
p177	90*	86	28	ELISA IgG	38	92	HA, Esq., Tox.	30
pGU4	90*	88	28	ELISA IgG	12-18	96-100	HA	29
pGU4	90*	86	28	ELISA IgG	18	98	HA, Esq., Tox.	30

\*Sueros de pacientes con hidatidosis confirmada quirúrgicamente.

\*\*Sueros de pacientes con hidatidosis confirmada mediante pruebas serológicas o técnicas de imagen.

rAgB: AgB recombinante; p-: péptido sintético; IB: *immunoblotting*; Cis.: cisticercosis; Esq.: esquistosomiasis; HA: hidatidosis alveolar; Onc.: oncocercosis; ELISA: análisis inmunoenzimático; IgG: inmunoglobulina G.

TABLA 3. Características principales de los ensayos para el serodiagnóstico de la hidatidosis humana basada en el uso del Ag5 y de los péptidos sintéticos derivados de esta molécula

Antígeno	Nº de sujetos estudiados			Ensayo	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Reactividad cruzada	Referencia
	Pacientes con hidatidosis	Pacientes con otras enfermedades	Sujetos sanos					
Ag5 nativo	90*	88	28	ELISA IgG	50	92	HA	29
Ag5 nativo	87*	289	200	Arc5	58-63	97	HA	8
Ag5 nativo	39*	51	29	ELISA IgG	54	89	HA	38
p89-122	40**	52	10	ELISA IgG, A, M	85	86	HA	39
p89-122	90*	88	28	ELISA IgG	16-23	77-100	HA	29
p89-122	39*	51	29	ELISA IgG	44	100	Ninguna	38

\*Sueros de pacientes con hidatidosis confirmada quirúrgicamente.

\*\*Sueros de pacientes con hidatidosis confirmada mediante pruebas serológicas o técnicas de imagen.

p-: péptido sintético; Arc5: inmunoprecipitación del arco 5; HA: hidatidosis alveolar; ELISA: análisis inmunoenzimático; IgG: inmunoglobulina G.

nas recombinantes han mostrado un elevado potencial diagnóstico, especialmente rEpC1<sup>18</sup> y rEgcMDH<sup>9</sup>. rEpC1 (sensibilidad: 92%; especificidad: 96%) es una secuencia parcial obtenida a partir de una biblioteca de cADN de protoescoléx de *E. granulosus* que codifica un polipéptido de 8,4 kDa, mientras que rEgcMDH (sensibilidad: 90%;

especificidad: 95%) es una isoforma de la enzima malato-deshidrogenasa aislada en el citosol del parásito adulto. Ambos antígenos recombinantes fueron evaluados utilizando un gran número de sueros humanos, por lo que pueden ser considerados como serios candidatos a antígenos estándar para el serodiagnóstico de la enfermedad. El ren-

TABLA 4. Características principales de los ensayos para el serodiagnóstico de la hidatidosis humana basada en el uso de extractos somáticos y proteínas recombinantes de protoescoléx de *E. granulosus*

Antígeno	N° de sujetos estudiados			Ensayo	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Reactividad cruzada	Referencia
	Pacientes con hidatidosis	Pacientes con otras enfermedades	Sujetos sanos					
SPx	147*	88	60	ELISA IgG	90	57	HA, Trip.	41
rEgcMDH	129*,**	65	203	ELISA IgG	90	95	Cis.	9
rEgCaBP2	129*,**	65	203	ELISA IgG	84	97	Cis., Tox.	9
rEgAFFPt	129*,**	65	203	ELISA IgG	59	96	Cis., Tox.	9
rEgAFFPf	129*,**	65	203	ELISA IgG	69	90	Sujetos sanos	9
rEpC1	324*	502	70	IB IgG	92	96	HA, Cis.	18
rTPxEg	100*	218	20	IB IgG	39	69	HA, Cis.	64
rEgG5	23*	138	20	IB IgG	61	70	HA, Cis.	64

\*Sueros de pacientes con hidatidosis confirmada quirúrgicamente.

\*\*Sueros de pacientes con hidatidosis confirmada mediante pruebas serológicas o técnicas de imagen.

SPx: extracto somático de protoescoléx; r-: proteína recombinante; IB: *immunoblotting*; Cis.: cisticercosis; HA: hidatidosis alveolar; Tox.: toxocaríasis; Trip.: tripanosomiasis; ELISA: análisis inmunoenzimático; IgG: inmunoglobulina G.

diminuto de los extractos somáticos y proteínas recombinantes de protoescoléx de *E. granulosus* en el inmunodiagnóstico de la hidatidosis humana se especifican en la tabla 4.

## Productos de excreción-secreción de protoescoléx y adultos

Los productos de excreción-secreción (PES) de protoescoléx y adultos de *E. granulosus* han sido previamente utilizados como fuentes antigénicas en el inmunodiagnóstico de la equinococosis canina<sup>42</sup>. Sin embargo, poco se conoce sobre estos extractos y su utilidad en el serodiagnóstico de la hidatidosis humana.

Recientemente nuestro laboratorio ha llevado a cabo la caracterización bioquímica de PES de protoescoléx, identificándose 20 componentes proteicos en SDS-PAGE<sup>43,44</sup>. De ellos, los polipéptidos de 89 y 74 kDa fueron identificados únicamente por sueros de pacientes con hidatidosis. La ausencia de reactividad cruzada frente a los sueros ensayados de pacientes con otras parasitosis y enfermedades permite proponer dichos componentes como antígenos estándar para el serodiagnóstico de la hidatidosis humana.

## Seguimiento de pacientes con hidatidosis después de tratamiento

Dependiendo de la estructura y las características individuales del quiste, actualmente existen tres opciones terapéuticas para el tratamiento de la hidatidosis humana: cirugía, técnica de drenaje PAIR (punción, aspiración, insilación, reaspiración) y quimioterapia con compuestos benzimidazólicos como el albendazol y el mebendazol<sup>7</sup>. Teniendo en cuenta que el riesgo de recurrencia es del 3-16% para las técnicas de resección y drenaje<sup>45</sup>, y que la acción del albendazol/mebendazol es más parasitostática que parasitocida, la diferenciación entre pacientes con enfermedad activa o progresiva e individuos curados es un aspecto clave para la evaluación del éxito o fracaso de la terapia empleada. Inicialmente, el seguimiento clínico de pacien-

tes con hidatidosis ha sido basado en la detección de isotipos y subclases de anticuerpos específicos contra antígenos de *E. granulosus*. Así, estudios previos en pacientes con estados avanzados de la enfermedad han puesto de manifiesto una marcada producción de anticuerpos IgG, especialmente de las subclases IgG1 e IgG4<sup>46,47</sup>. Posteriormente, Riganò et al<sup>48</sup> observaron que pacientes con una respuesta favorable al tratamiento con albendazol presentaban niveles de IgG4 significativamente inferiores a los de aquellos con escasa o nula respuesta al tratamiento, mientras que la subclase IgG1 mostraba la tendencia contraria. A su vez Shambesh et al<sup>49</sup> propusieron que la elevada respuesta de IgG1 es una característica propia de la fase asintomática de la infección, produciéndose un cambio de síntesis de IgG1 a síntesis de IgG4 cuando la enfermedad se torna sintomática. Finalmente, Daeki et al<sup>50</sup> mostraron que la elevada respuesta de IgG4 estaba ligada a estadios de desarrollo y crecimiento del quiste hidatídico, mientras que las subclases IgG1, IgG2 e IgG3 estaban asociadas a procesos de degeneración/calcificación del quiste. Todos estos datos aportan una creciente evidencia de la correlación entre el nivel de IgG4 específica y la progresión de la enfermedad. De forma similar otros estudios han descrito también correlaciones positivas entre el nivel de IgE y el estado de desarrollo de la infección<sup>12,51-53</sup>. Sin embargo, el descenso de los niveles de IgE específica es lento, y anticuerpos de este isotipo son aún detectables después de un año tras la eliminación del quiste<sup>54</sup>. Aunque IgA e IgM también presentan respuestas elevadas en pacientes con hidatidosis activa, su persistencia, incluso durante períodos de 3 años o más, hace que estos isotipos no sean de utilidad para el seguimiento del curso de la infección<sup>55,56</sup>.

Recientemente se han desarrollado nuevas estrategias con el fin de mejorar la prognosis de la enfermedad tras tratamiento quirúrgico o farmacológico, basadas en observaciones que demuestran que la activación de linfocitos Th1/Th2 tiene un papel destacado en la evolución de la infección. En la mayoría de las parasitosis una elevada respuesta Th2 es indicativa de susceptibilidad a la enfermedad, mientras que una respuesta Th1 está asociada con el desarrollo de mecanismos de inmunoprotección<sup>24</sup>. Una

de las características más destacadas de la hidatidosis humana es la coexistencia de respuestas Th1/Th2. Así, la eliminación/inactivación del quiste hidatídico tras cirugía o tratamiento farmacológico produce una caída drástica de la respuesta Th2, mientras que la respuesta Th1 adquiere entonces especial predominancia<sup>57</sup>. Las poblaciones de linfocitos Th1 y Th2 mantienen un equilibrio que está estrictamente regulado mediante la producción de citocinas específicas. Así, elevados niveles de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) asociados con escasa producción de interleucina 10 (IL-10) y ausencia de IL-4 han sido hallados en pacientes con hidatidosis que mostraban una evolución favorable al tratamiento con albendazol y mebendazol (respuesta Th1). Por el contrario, altos niveles de IL-4 e IL-10 asociados con escasa o nula producción de IFN- $\gamma$  han sido detectados en pacientes refractarios al tratamiento farmacológico<sup>58</sup> (respuesta Th2). Estos datos demuestran que la determinación de los niveles de citocinas específicas, particularmente IL-4, es un buen indicador de la evolución de la infección tras tratamiento quirúrgico o farmacológico.

Estudios similares<sup>59</sup> han puesto de manifiesto que pacientes hidatídicos con serología negativa no presentan niveles significativos de IL-5, citocina que sin embargo es abundantemente expresada en pacientes seropositivos. Esta interesante observación indica claramente que IL-5 tiene una importancia vital en la regulación de la expresión de inmunoglobulinas, y su determinación puede mejorar considerablemente la sensibilidad del serodiagnóstico de la enfermedad al reducir el número de falsos negativos.

## Conclusiones

El principal problema del serodiagnóstico de la hidatidosis humana es la falta de antígenos de elevada especificidad y sensibilidad cuyo proceso de obtención sea fácilmente estandarizable. El líquido hidatídico bruto y especialmente las fracciones purificadas del AgB y el Ag5 han constituido durante décadas las principales fracciones antigénicas utilizadas con fines diagnósticos. Sin embargo, dos nuevos campos de investigación han centrado los más destacados avances en el inmunodiagnóstico de la enfermedad en los últimos años. En primer lugar, la obtención y uso de secuencias recombinantes, que han demostrado características diagnósticas superiores a las de sus proteínas nativas homólogas y además permiten la estandarización de la fuente antigénica. En segundo lugar, la irrupción de nuevos antígenos procedentes de extractos antigénicos de otros estadios de desarrollo de *E. granulosus*, como protoescolex y adultos. A pesar del innegable progreso realizado, hay que recordar que actualmente no existe una técnica de diagnóstico estandarizada que aúne elevada sensibilidad y especificidad, por lo que la identificación y caracterización de nuevos antígenos y la estandarización de técnicas y extractos antigénicos sigue siendo una de las tareas prioritarias con el fin de mejorar el inmunodiagnóstico de la hidatidosis humana.

## Bibliografía

- McManus DP, Zhang W, Li J, Rishi AK. Echinococcosis. Lancet. 2003;362:1295-304.
- Romig T, Dinkel A, Mackenstedt U. The present situation of echinococcosis in Europe. Parasitol Int. 2006;55:S187-S91.
- Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar social. Boletín Epidemiológico de Castilla y León. 2001;17:21-4.
- Jiménez S, Pérez A, Gil H, Schantz PM, Ramalle E, Juste RA. Progress in control of cystic echinococcosis in La Rioja, Spain: decline in infection prevalences in human and animal hosts and economic costs and benefits. Acta Trop. 2002;83:213-21.
- Castilla J, Irisarri F, Barricarte A, Zabala A, Morillo C, Urtiaga M. Situación de las Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO) en Navarra, 2004. An Sist Sanit Navar. 2005;28:93-104.
- Sayek I, Tirnaksiz MB, Dogan R. Cystic hydatid disease: current trends in diagnosis and management. Surg Today. 2004;34:987-96.
- Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. Clin Microbiol Rev. 2004;17:107-35.
- Poretti D, Felleisen E, Grimm F, Pfister M, Teuscher F, Zuercher C, et al. Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. Am J Trop Med Hyg. 1999;60:193-8.
- Virginio VG, Hernández A, Rott MB, Monteiro KM, Zandonai AF, Nieto A, et al. A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. Clin Exp Immunol. 2003;132:309-15.
- Gottstein B. Molecular and immunological diagnosis of echinococcosis. Clin Microbiol Rev. 1992;5:248-61.
- Orduña A, Zarzosa P, Abad R, Bratos M, Sainz M, Gutiérrez P, et al. Influence of factors related to cysts in the sensitivity of six serological tests for diagnosis of human hydatid disease. Arch Int Hidatid. 1997;32:280-6.
- Ortona E, Riganò R, Buttari B, Delunardo F, Ioppolo S, Margutti P, et al. An update on immunodiagnosis of cystic echinococcosis. Acta Trop. 2003;85:165-71.
- Irabuena O, Nieto A, Ferreira A, Battistoni J, Ferragut G. Characterization and optimization of bovine *Echinococcus granulosus* cyst fluid to be used in immunodiagnosis of hydatid disease by ELISA. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2000;42:255-62.
- Liance M, Janin V, Bresson-Hadni S, Vuitton DA, Houin R, Piarroux R. Immunodiagnosis of Echinococcus infections: confirmatory testing and species differentiation by new commercial Western blot. J Clin Microbiol. 2000;38:3718-21.
- Leggatt GR, Yang W, McManus DP. Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in *Echinococcus granulosus* cyst fluid by immunoblot analysis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992;86:189-92.
- Riganò R, Profumo E, Bruschi F, Carulli G, Azzara A, Ioppolo S, et al. Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. Infect Immun. 2001;69:288-96.
- Zhang W, Li J, McManus DP. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. Clin Microbiol Rev. 2003;16:18-36.
- Li J, Zhang W-B, Wilson M, Ito A, McManus DP. A novel recombinant antigen for immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. J Infect Dis. 2003;188:1951-60.
- García Albea E. Cisticercosis en España. Algunos datos epidemiológicos. Rev Clin Esp. 1989;184:3-6.
- Ammann RW, Eckert J. Cestodes: Echinococcus. Gastroenterol Clin North Am. 1996;25:655-89.
- WHO. Eckert J, Gemmell MA, Meslin F-X Pawlowski ZS, editors. WHO/OIE Manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. Paris: WHO/OIE; 2001.
- Oriol R, Williams JF, Pérez Esandi MV, Oriol C. Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. Am J Trop Med Hyg. 1971;20:569-74.
- Lightowler MW, Liu D, Haralambous A, Rickard MD. Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. Mol Biochem Parasitol. 1989;37:171-82.
- Shepherd JC, Aitken A, McManus DP. A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. Mol Biochem Parasitol. 1991;44:81-90.
- Ortona E, Riganò R, Margutti P, Notargiacomo S, Ioppolo S, Vaccari S, et al. Native and recombinant antigens in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. Parasite Immunol. 2000;22:553-9.
- Maddison SE, Slemenda SB, Schantz PM, Fried JA, Wilson M, Tsang VCW. A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa. Am J Trop Med Hyg. 1989;40:377-83.
- Haag KL, Alves-Junior L, Zaha A, Ayala FJ. Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: natural selection and gene conversion in the *Echinococcus granulosus* antigen B gene family. Gene. 2004;333:157-67.
- McVie A, Ersfeld K, Rogan MT, Craig PS. Expression and immunological characterisation of *Echinococcus granulosus* recombinant antigen B for IgG4 subclass detection in human cystic echinococcosis. Acta Trop. 1997;67:19-35.
- Barbieri M, Fernández V, González G, Martínez V, Nieto A. Diagnostic evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as re-



- lated to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hydatidosis. *Parasite Immunol.* 1998;20:51-61.
30. González-Sapienza G, Lorenzo C, Nieto A. Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using a synthetic peptide with higher diagnostic value than that of its parent protein, *Echinococcus granulosus* antigen B. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3979-83.
  31. Capron A, Vernes A, Biguet J. Le diagnostic immuno-électrophorétique de l'hydatidose. En: *Le Kyste Hydatique du Foie*. Lyon: SIMEP; 1967. p. 27-40.
  32. Di Felice G, Pini C, Afferni C, Vicari G. Purification and partial characterization of the major antigen of *Echinococcus granulosus* (antigen 5) with monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol.* 1986;20:133-42.
  33. Lorenzo C, Salinas G, Brugnini A, Wernstedt C, Hellman U, González-Sapienza G. *Echinococcus granulosus* antigen 5 is closely related to proteases on the trypsin family. *Biochem J.* 2003;369:191-8.
  34. Zhang L, McManus DP. Purification and N-terminal amino acid sequencing of *Echinococcus granulosus* antigen 5. *Parasite Immunol.* 1996;18:597-606.
  35. Schantz PM, Gottstein B. *Echinococcosis (hydatidosis)*, vol. 1. Orlando: Academic Press Inc; 1986.
  36. Shepherd JC, McManus DP. Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Mol Biochem Parasitol.* 1987;25:143-54.
  37. Maizels RM, Selkirk ME. Immunobiology of nematode antigens. En: Englund PT, Sher A, editors. *The biology of parasitism*. Vol. 9. New York: Alan R. Liss; 1989. p. 285-308.
  38. González G, Spinelli P, Lorenzo C, Hellman U, Nieto A, Willis A, et al. Molecular characterization of P-29, a metacestode-specific component of *Echinococcus granulosus* which is immunologically related to, but distinct from, antigen 5. *Mol Biochem Parasitol.* 2000;105:177-84.
  39. Chamekh M, Gras Masse H, Bossus M, Facon B, Dissous C, Tartar A, et al. Diagnostic value of a synthetic peptide derived from *Echinococcus granulosus* recombinant protein. *J Clin Invest.* 1992;89:458-64.
  40. Siles-Lucas M, Gottstein B. Molecular tools for the diagnosis of cystic and alveolar echinococcosis. *Trop Med Int Health.* 2001;6:463-75.
  41. Rafiei A, Craig PS. The immunodiagnostic potential of protoscolex antigens in human cystic echinococcosis and the possible influence of parasite strain. *Ann Trop Med Parasitol.* 2002;96:383-9.
  42. Benito A, Carmena D. Double-antibody sandwich ELISA for the detection of *Echinococcus granulosus* coproantigens in dogs. *Acta Trop.* 2005;95:9-15.
  43. Carmena D, Martínez J, Benito A, Guisantes JA. Characterization of excretory-secretory products from protoescoleces of *Echinococcus granulosus* and evaluation of their potential for immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Parasitology.* 2004;129:371-8.
  44. Carmena D, Martínez J, Benito A, Guisantes JA. Shared and non-shared antigens from three different extracts of the metacestode of *Echinococcus granulosus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;100:861-7.
  45. Yagci G, Ustunsoz B, Kaymakcioglu N, Bozlar U, Gorgulu S, Simsek A, et al. Results of surgical, laparoscopic, and percutaneous treatment for hydatid disease of the liver: 10 years experience with 355 patients. *World J Surg.* 2005;29:1670-9.
  46. Aceti A, Pennica A, Teggi A, Fondacaro LM, Caferro M, Leri O, et al. IgG subclasses in human hydatid disease: prominence of the IgG4 response. *Int Arch Allergy Immunol.* 1993;102:347-51.
  47. Wen H, Craig PS. IgG subclass response in human cystic and alveolar echinococcosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;51:741-8.
  48. Riganò R, Profumo E, Ioppolo S, Notargiacomo S, Ortona E, Teggi A, et al. Immunological markers indicating the effectiveness of pharmacological treatment in human hydatid disease. *Clin Exp Immunol.* 1995;102:281-5.
  49. Shambesh MK, Craig PS, Wen H, Rogan MT, Paolillo E. IgG1 and IgG4 serum antibodies responses in asymptomatic and clinically expressed cystic echinococcosis patients. *Acta Trop.* 1997;64:53-63.
  50. Daeki O, Craig PS, Shambesh MK. IgG-subclass antibody responses and the natural history of hepatic cystic echinococcosis in asymptomatic patients. *Ann Trop Med Parasitol.* 2000;94:319-28.
  51. Dreweck CM, Luder CG, Soboslay PT, Kern P. Subclass-specific serological reactivity and IgG4-specific antigen recognition in human echinococcosis. *Trop Med Int Health.* 1997;2:779-87.
  52. Riganò R, Ioppolo S, Ortona E, Margutti P, Profumo E, Ali MD, et al. Long-term serological evaluation of patients with cystic echinococcosis treated with benzimidazole carbamates. *Clin Exp Immunol.* 2002;129:485-92.
  53. Torcal J, Navarro-Zorraquino M, Lozano R, Larrad L, Salinas JC, Ferrer J, et al. Immune response and in vivo production of cytokines in patients with liver hydatidosis. *Clin Exp Immunol.* 1996;106:317-22.
  54. Guisantes JA, Vicente-García F, Abril JM, Eraso E, Martínez J. Total and specific IgE levels in human hydatid disease determined by enzyme immunoassay: serological follow-up after surgery. *J Invest Allergol Clin Immunol.* 1994;4:301-4.
  55. Bulut V, İlhan F, Yucel AY, Onal S, İlhan Y, Godekmerdan A. Immunological follow-up of hydatid cyst cases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96:669-71.
  56. Doiz O, Benito R, Gil J, Rojas A, Rubio MC, Osuna A. Pre- and postsurgical of IgG, IgM, and IgA specific to hidatidosis by ELISA with purified antigen enriched with the 5/B antigen complex. *J Clin Lab Anal.* 2002;16:295-8.
  57. Zhang W, McManus DP. Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006;47:24-41.
  58. Riganò R, Profumo E, Ioppolo S, Notargiacomo S, Teggi A, Siracusano A. Serum cytokine detection in clinical follow up of patients with cystic echinococcosis. *Clin Exp Immunol.* 1999;115:503-7.
  59. Riganò R, Profumo E, Ioppolo S, Notargiacomo S, Teggi A, Siracusano A. Cytokine patterns in seropositive and seronegative patients with *Echinococcus granulosus* infection. *Immunol Letters.* 1998;64:5-8.
  60. Barbieri M, Sterla S, Battistoni J, Nieto A. High performance latex reagent for hydatid serology using an *Echinococcus granulosus* lipoprotein antigen fraction purified from cyst fluid in one step. *Int J Parasitol.* 1993;23:565-72.
  61. Lorenzo C, Ferreira HB, Monteiro KM, Rosenvitz M, Kamenetzky L, García HH, et al. Comparative analysis of the diagnostic performance of six major *Echinococcus granulosus* antigens assessed in a double-blind, randomized multicenter study. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2764-70.
  62. Rott MB, Fernández V, Farias S, Ceni J, Ferreira HB, Haag KL, et al. Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. *Acta Trop.* 2000;75:331-40.
  63. Ito A, Ma L, Schantz PM, Gottstein B, Liu YH, Chai JJ, et al. Differential serodiagnosis for cystic and alveolar echinococcosis using fractions of *Echinococcus granulosus* cyst fluid (antigen B) and *E. multilocularis* protoscolex (Em18). *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60:188-92.
  64. Li J, Zhang W-B, McManus DP. Recombinant antigens for immunodiagnosis of cystic echinococcosis. *Biological Proc.* 2004;6:67-77.