

Revista Mexicana de Patología Clínica

Volumen 51
Volume

Número 2
Number

Abril-Junio 2004
April-June

Artículo:

Valor diagnóstico de inmunoblot con líquido hidatídico humano, frente a antígeno ovino y bovino

Derechos reservados, Copyright © 2004:
Federación Mexicana de Patología Clínica, AC

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Edigraphic.com

Valor diagnóstico de inmunoblot con líquido hidatídico humano, frente a antígeno ovino y bovino

Palabras clave: Inmunoblot, antígeno hidatídico humano, antígeno hidatídico ovino, antígeno hidatídico bovino, diagnóstico serológico de hidatidosis.

Key words: Immunoblot, human hydatid fluid, ovine hydatid antigen, bovine hydatid antigen, serological diagnostic of hydatidosis.

Recibido:19/09/2003

Aceptado:23/10/2003

Juan Carlos Gómez de la Torre Pretell*

* Patología Clínica. Hospital Central de la Fuerza Aérea del Perú.

Correspondencia:
E-mail:jcgomez@eudoramail.com

Resumen

Objetivo: Determinar el valor diagnóstico de la prueba de inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico procedente de humano y compararlo con el antígeno bovino y ovino. **Métodos:** Fueron estudiados 40 pacientes con enfermedad hidatídica confirmada quirúrgicamente, 20 individuos con otras enfermedades y 20 sujetos sanos. A cada paciente se le realizó la prueba de inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico procedente de quiste hepático humano, así como con antígeno hidatídico procedente de Pool bovino y de ovino. **Resultados:** La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la prueba de inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico humano con la banda de 38 KDa fue, respectivamente, de 88, 75, 78 y 100%; antígeno bovino con la banda de 38 KDa fue de 75, 100, 100, 100% y antígeno ovino con la banda de 21-31 KDa fue de 95, 95, 95 y 100%. **Conclusión:** La prueba de inmunoblot, usando antígeno hidatídico procedente de humano, presenta menor valor diagnóstico que aquella con antígeno hidatídico bovino y ovino.

75

Summary

Objective: To determine the diagnostic value of the test of Immunoblot using hydatid antigen coming from human and to compare it with the bovine and ovine antigen. **Methods:** 40 patients were studied with hydatid disease confirmed surgically, 20 patients with other illnesses and 20 healthy patients. To each patient they were carried out the test of Immunoblot using hydatid antigen coming from human hepatic cyst, likewise with hydatid antigen coming from bovine and ovine pool. **Results:** The sensibility, specificity, Positive Predictive Value and Negative predictive value of the test of Immunoblot using antigen from Human fluid with the band of 38 KDa was of 88, 75, 78 and 100%, bovine antigen with the band of 38 KDa was of 75, 100, 100, 100% and ovine antigen with the band of 21-31 KDa was of 95, 95, 95 and 100% respectively. **Conclusion:** The test of Immunoblot using hydatid antigen coming from human presents smaller diagnostic value than using bovine and ovine antigen.

Introducción

La hidatidosis humana, zoonosis causada por el estadio larval (metacestodo) del *Echinococcus*

granulosus, el cual se alberga principalmente en el perro, es una enfermedad endémica en muchos países, siendo muy pocas las naciones que han logrado erradicar esta zoonosis de sus tierras, den-

tro de los cuales podemos mencionar a Nueva Zelanda, Tasmania e Islandia.¹

La hidatidosis en Sudamérica tiene gran prevalencia en países como Argentina y Chile, reportándose en este último tasas que alcanzan los 1,068 x 100,000 habitantes.²

En el Perú no existen datos epidemiológicos actualizados sobre esta enfermedad. Sin embargo, según reportes de hace más de una década, la incidencia de la hidatidosis en el Perú alcanzaba cifras de 1,780 x 100,000 habitantes (SAIS-Pachacutec, Junín),³ lo cual significa gran pérdida de recursos materiales. En Uruguay, país en el que se aplica toda una política en contra de la hidatidosis, habiéndose disminuido considerablemente la parasitosis ovina, bovina y humana en la última década, las pérdidas económicas en un año fueron de 1'650,000 dólares, aproximadamente, considerando tan sólo la pérdida por venta de vísceras.¹ No sería raro que en el Perú estas cifras sean mayores.

Es lamentable decir que el Perú es uno de los países con más prevalencia de hidatidosis en América y que, a pesar de ello, no existe ninguna política para controlar ni evaluar el impacto ocasionado por la enfermedad.

Una vez ingeridos los huevos del *Echinococcus granulosus*, éstos evolucionan a su estadio larval, el cual migra a través del intestino al sistema porta; las larvas pasan por los sinusoides hepáticos y llegan hasta el pulmón, pudiendo pasar y albergarse en cualquier órgano de la economía, en donde forman una estructura quística. La mayoría de los quistes se localizan en el hígado, luego el pulmón y en menor cuantía los demás órganos.⁴ La sintomatología que produce la enfermedad hidatídica es muy variada, pero es asintomática en la mayoría de los casos.⁵ En algunas zonas endémicas de Argentina, 67% de portadores asintomáticos permanecen así durante toda su vida.⁶ Son muchos los métodos utilizados para el diagnóstico de la enfermedad hidatídica, pudiéndose mencionar: radiografía, tomografía, resonancia magnética y ecografía, esta última de gran utilidad en el diagnóstico.⁷

El tratamiento es quirúrgico en la mayoría de los casos.⁸ Sin embargo, se está realizando aspiración percutánea asociada a tratamiento médico, lo que ha dado muy buenos resultados.⁵

El tratamiento médico está indicado en ciertos casos, pero la tasa de curación completa en las diferentes series no iguala a la quirúrgica ni a la de aspiración transcutánea.^{5,6,9}

El quiste hidatídico desencadena una respuesta inmune predominantemente Th2, con la producción de IgM, IgE e IgG, destacándose a la IgG1 e IgG4,^{10,11} las cuales están dirigidas a diferentes componentes antigenicos del quiste hidatídico, siendo los de mayor relevancia el antígeno 5 (Ag5) y el antígeno B(AgB),¹²⁻¹⁴ los cuales tienen una relación de 1:10 en el líquido hidatídico. El Ag5 es un complejo de lipoproteína de gran peso molecular compuesto por fragmentos de 57 y 67 KD, los cuales bajo condiciones de reducción se disocian en subunidades de 38 y 22 a 24 KD. Este antígeno es compartido por varios parásitos, incluso pacientes sanos tienen anticuerpos que reconocen epítopes del Ag5. El AgB, el cual constituye 10% del contenido total del líquido hidatídico es una lipoproteína termoestable de 160 KD, la cual produce tres subunidades de ocho o 12, 16 y 20 o 24 KD en electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras. Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que esta proteína está localizada en el tegumento del protoescólex y membrana germinativa del metacestodo de donde es secretada al líquido hidatídico.¹⁵ Ésta es una de las proteínas que más caracterizan al quiste hidatídico, siendo un componente antigenico de mucha especificidad para la equinococosis; sin embargo, es compartida entre las diferentes especies de *Echinococcus*.¹⁶

Son muchos los métodos desarrollados para el diagnóstico inmunológico de la hidatidosis humana, pudiéndose mencionar a la prueba de dermorreacción de Cassoni (historia), inmunoelectroforesis, doble difusión arco V,¹⁷ hemaglutinación indirecta,¹⁸ aglutinación con partículas de látex,

coaglutinación con *Staphylococcus aureus* portadores de proteína A,¹⁹ respuesta linfoproliferativa a antígeno hidatídico (LPA),²⁰ inmunoensayo ligado a enzima (ELISA)²¹⁻²³ e inmunoblot.^{19,24} Estas últimas de gran importancia, ya que todos los esfuerzos actuales están puestos en determinar o sintetizar una proteína, la cual sea reconocida sólo en la enfermedad hidatídica.^{25,26} Es así que los diferentes investigadores encuentran distintas sensibilidades a las pruebas de ELISA e inmunoblot, ya que éstas dependen no sólo de la localización y estadio del quiste, sino también del antígeno y de los pacientes utilizados para la investigación.^{6,15,27-31} El *Echinococcus granulosus* no está exento de variabilidad genética en su especie, es por eso que la respuesta inmune de una población no será la misma que otra, siendo el responsable de eso el propio quiste hidatídico, razón por la cual se pueden evidenciar diferentes patrones de reactividad en los diferentes estudios.^{32,33}

Por otro lado, en un trabajo realizado anteriormente en el que se utilizó antígeno hidatídico proveniente de humano y ovino para sensibilizar placas de ELISA con el fin de evaluar la sensibilidad y especificidad de éstas en el diagnóstico de hidatidosis humana (datos no publicados), se pudo evidenciar que cuando se sensibilizaban las placas con antígeno humano, las densidades ópticas de la reacción enzimática de los sueros de los pacientes con hidatidosis eran muy superiores a las encontradas con antígeno ovino, no sucediendo lo mismo en los pacientes sanos, lo cual hace pensar que el antígeno humano es mejor para el diagnóstico de la hidatidosis humana.

Son estas características las que hacen suponer que utilizando quiste hidatídico humano, proveniente de pacientes de nuestra región, para la prueba de inmunoblot, se puede encontrar un valor diagnóstico más alto que con antígenos de ovino o bovino.

Existen varios métodos de diagnóstico para la hidatidosis humana; sin embargo, la sensibilidad y especificidad de éstos depende de la localización

del quiste, el estadio evolutivo, los pacientes estudiados y las cepas de los quistes, pudiendo variar de localidad en localidad; es por esto que, utilizando antígeno hidatídico proveniente de pacientes infectados en el Perú, se puede conseguir un valor diagnóstico superior a las pruebas que utilizan quistes de ovino o bovino.

El objetivo general de este estudio fue determinar el valor diagnóstico de la prueba de inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico procedente de humano. Mientras que los objetivos específicos fueron: 1) Caracterizar el contenido proteico del líquido hidatídico de quistes provenientes de humanos, bovinos y ovinos infectados en el Perú, según el patrón de migración electroforetica. 2) Determinar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la prueba de inmunoblot, utilizando antígenos provenientes de humanos, bovinos y ovinos para el diagnóstico de hidatidosis humana y 3) Comparar el valor diagnóstico de la prueba de inmunoblot, también utilizando antígeno proveniente de humanos, bovinos y ovinos para el diagnóstico de hidatidosis humana.

77

Material y métodos

1. Participantes. Se recolectaron 40 sueros de pacientes con confirmación quirúrgica de hidatidosis humana de distintas ubicaciones, 20 sujetos con otras enfermedades dentro de las cuales figuran: cisticercosis, fascioliasis, toxoplasmosis, malaria, hepatocarcinoma, etcétera, incluyendo un grupo de 20 individuos clínica y radiológicamente (tórax) sanos. Ningún paciente fue portador de alguna enfermedad que comprometiera su sistema inmune.

2. Antígenos. Se extrajo líquido de vísceras infestadas con quiste hidatídico de ganado ovino y bovino de la Sierra Central del Perú, además de líquido hidatídico de una mujer con hidatidosis hepática que fue intervenida en un nosocomio de la ciudad de Lima, siendo condición de ésta que no hubiese salido del Perú en los últimos 10

años para asegurar que la infección fue adquirida en el Perú, además de no haber recibido tratamiento médico para hidatidosis. Los líquidos hidatídicos fueron centrifugados a 2,000 g por 20 minutos en centrífuga refrigerada; luego se colocaron en membranas de nitrocelulosa y se les dializó con 100 veces su volumen en agua destilada, realizando cambios de agua cuatro veces en cuatro días y a una temperatura de 4° C. Terminada la dialización, se colocó en frascos de 25 mL para su liofilización, previo el cultivo respectivo en agar chocolate y a la realización de la prueba de DD5 con suero hiperinmune para comprobar la presencia de antígeno hidatídico.

- 3. Preparación del suero hiperinmune anti-hidatídico.** Se tomó 2 mg de polvo del antígeno hidatídico liofilizado líquido en 2 mL de PBS pH 7.4; de la dilución se tomó 2 mL y se mezcló con 2 mL de coadyuvante completo de Freund, inoculándole 1 mL en cada pata (entre el tendón del semimembranoso y el del semitendinoso) a dos conejos blancos de 3 kg de peso cada uno. Treinta días después se inoculó la misma cantidad de antígeno, pero con coadyuvante incompleto de Freund, de la misma manera que la primera vez. Diez días más tarde se realizó sangría total a los dos conejos, amarrándolos de las cuatro patas en una mesa de disección, con la ayuda de una bomba de vacío se preparó dos vías dirigidas a un frasco y los extremos a la bomba y el otro a una aguja # 18, la cual se introdujo al corazón del conejo, previa palpación del latido cardiaco con el dedo pulgar. Una vez introducida la aguja al corazón, se prende la bomba de vacío y se consigue la sangre necesaria.
- 4. Técnica de inmunoblot.** A. Separación de las proteínas del antígeno por electroforesis en un gel de poliacrilamida que contenía dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

- a) *Preparación del antígeno.* Se tomó 15 mg de polvo liofilizado y se mezcló con 300 µL de buffer

Tris/HCL 0.05 M, pH 8.0, con el fin de conseguir una concentración de 50 mg/mL y se centrifugó a 3,500 rpm por 30 minutos. El sobrenadante se conservó a -80 grados centígrados hasta el momento de su uso.

- b) *Tratamiento del antígeno.* El antígeno preparado se diluyó volumen a volumen con una solución de tratamiento de muestra. Luego se colocó en baño María a 100° C por cinco minutos. Despues se adicionó un colorante marcador de corriente a razón de 1 µL por cada 30 µL de muestra pretratada.
- c) *Tratamiento del patrón de masas moleculares relativas.*
- d) *Preparación del gel de separación o de corrida.* Se utilizaron dos placas de vidrio de 73 x 102 x 1 mm y otras dos de 70 x 102 x 1 mm, además de cuatro espaciadores de plástico de 0.75 mm de espesor. Se limpiaron las placas de vidrio con alcohol y luego se secaron con gasa estéril. Una vez limpiadas las placas, se montaron una con otra, colocando los espaciadores en medio y con la ayuda de vaselina untada en dichos espaciadores. Seguidamente, se preparó el gel de separación a una concentración de 15%, y con una jeringa de aguja 22 y con punta circular se roció el gel, evitando la formación de burbujas entre las dos placas hasta aproximadamente 1 cm de la parte superior de la placa de menor tamaño; en el espacio que quedó se colocó agua destilada. Se dejó polimerizando por 30 minutos a temperatura ambiente.
- e) *Preparación del gel de empaquetamiento.* Se eliminó el agua destilada y se preparó el gel de empaquetamiento; el cual se colocó de la misma manera que el anterior hasta la parte superior de la placa. Inmediatamente después se colocaron los peines separadores de especímenes de 0.75 mm de espesor, según fuese el propósito de la electroforesis, dejando un espacio entre el gel de separación y el de empaquetamiento. Se dejó polimerizando por 30 minutos a temperatura ambiente.

- f) *Preparación de la electroforesis.* Finalizada la polimerización, se extrajeron los peines y se lavaron las cavidades con buffer Tris-glicina-SDS o tampón de corrida. Luego, en el orificio de la derecha, se aplicaron 5 μ L de la solución de peso molecular patrón y 3 μ L de la solución de peso molecular patrón coloreado (preteñido); en los demás orificios se colocaron las soluciones de antígenos. Se colocaron, aproximadamente, 200 mL de tampón de corrida en el recipiente superior (preparado el día de la corrida electroforética) y 300 mL del mismo tampón en el recipiente inferior de la cubeta (también preparado el mismo día o no de la corrida electroforética). Después de esto, se inició la corrida.
- g) *Corrida electroforética.* Se conectaron las terminales eléctricas a la fuente de poder con 80 voltios, 0.02 amperios y durante 10 minutos, hasta que los marcadores de corrida se nivelaron de manera uniforme. Inmediatamente después, se duplicó el voltaje, y con un amperaje de 0.06, se dio inicio a la corrida hasta el momento en que los marcadores de corrida llegaron a la base de los geles. Se esperó 10 minutos y se desconectó el sistema.

B. Transferencia de proteínas del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa

Las proteínas fueron transferidas electroforéticamente del gel a la membrana de nitrocelulosa con poros de 0.22 μ m, para lo cual se empleó un recipiente de electroforesis.

- a) *Preparación de la transferencia.* En un recipiente que contenía buffer de transferencia, se colocó el gel sobre una membrana de nitrocelulosa. A su vez, ésta se colocó entre dos hojas de papel filtro embebido en el mismo buffer. El conjunto de gel, nitrocelulosa y papel filtro, se colocaron entre dos esponjas de 3 mm de espesor, embebidas en el tampón de transferencia de igual manera que el complejo anterior; luego se co-

locó todo en una pieza de plástico con orificios en ambos lados, asegurándose que el gel quede frente al cátodo (color negro de la pieza) y la nitrocelulosa frente al ánodo (transparente). Seguidamente la pieza se encajó en la cámara de transferencia, la cual contenía una base plástica para poner agua congelada.

- b) *Electrotransferencia.* La electrotransferencia se efectuó a una corriente, variando de 1.5 A a 10° C hasta 2.05 A a 35° C al final del proceso, manteniendo un voltaje de 55 voltios por una hora. Una vez finalizada la electrotransferencia, se retiraron las membranas de nitrocelulosa y se lavaron cinco veces durante cinco minutos cada una, con buffer fosfato salino (PBS) 0.01 m pH 7.2 conteniendo 0.3% de tween 20(PBS/T) y se lavó una vez más con PBS sin Tween. Luego se cortaron las tiras de nitrocelulosa que contenían los antígenos en diámetros de 3 a 4 mm, y la tira de los pesos moleculares se tiñeron con tinta china al 1%. Se cortaron las tiras de nitrocelulosa que contenían las proteínas del antígeno, en diámetros de 3 mm, y se guardaron a -20° C entre hojas de papel filtro humedecidas en PBS hasta el momento de su uso.

C. Tercera etapa: reacción inmunoenzimática

Se emplearon placas de plástico divididas en compartimentos. Se colocaron tiras de nitrocelulosa que contenían antígeno hidatídico en los compartimentos de las placas. Se incubaron las tiras con PBS-TL y se colocaron los sueros problema diluidos 1:100 en PBS-TL e incubaron por una hora. Se lavaron las placas cinco veces durante cinco minutos cada una con PBS-T y una vez más con PBS solo. Se adicionó la solución de anti IgG humano marcado con peroxidasa diluido a 1:1000 en PBS-TL e incubó por una hora. Se lavaron las placas cinco veces durante cinco minutos cada una con PBS-T y una vez más con PBS solo. Se reveló la reacción adicionando una solución que contenía 5 mg de diamino bencina (DAB) 10 μ L de H_2O_2

(30%) para cada 10 mL de PBS. Luego de visualizar las bandas, se lavaron las tiras varias veces con agua desionizada. Se dejaron secar las tiras a temperatura ambiente en oscuro.

5. Procedimientos. Luego de la liofilización de los líquidos hidatídicos, éstos se enfrentaron al suero hiperinmune para confirmar la presencia de antígeno hidatídico. Después se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida de los diferentes antígenos y fueron coloreados con tinta china para caracterizar los componentes proteicos de cada uno de los antígenos. Esto se realizó por comparación de bandas con el patrón utilizado.

Luego de una segunda corrida electroforética, se realizó la electrotransferencia a las membranas de nitrocelulosa para realizar el inmunoensayo a todos los pacientes mencionados, utilizando antígeno hidatídico humano, bovino y ovino. De esta manera se evaluó la reactividad de bandas de los diferentes antígenos.

Una vez determinada la banda óptima, se calculó la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la prueba para los diferentes antígenos utilizando el teorema de Bayes.

80

Resultados

En el cuadro I se observa que la banda de 38 KDa se presentó en la mayoría de pacientes con hidatidosis. El resto de bandas también se observaron en los otros pacientes.

El cuadro II muestra que la banda de 38 KDa se presentó en la minoría de sujetos sin hidatidosis. Las demás bandas también se observan en los otros individuos.

En el cuadro III se aprecia que la banda de 38 KDa se presentó en la mayoría de enfermos con hidatidosis. El resto de bandas también se registraron en los otros pacientes.

El cuadro IV manifiesta que la banda de 38 KDa se presentó en la minoría de personas sin hidati-

dosis. Las bandas restantes también se observaron en los otros sujetos.

En el cuadro V se observa que la banda que se encuentra entre 21-31 KDa se presentó en la mayoría de enfermos con hidatidosis. El resto de bandas también se registraron en los otros pacientes.

En el cuadro VI se observa que la banda que se encuentra entre 21-31 38 KDa se presentó en la minoría de sujetos sin hidatidosis, el resto de bandas también se observan en los otros individuos.

Discusión

En las figuras 1, 2 y 3 se muestran las diferentes corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida de los antígenos hidatídicos procedentes de quistes humano, bovino y ovino respectivamente. Los tres antígenos presentan distintas bandas, lo que significa que por más que se trate del mismo parásito, las proteínas que se encuentran en distintos hospederos son diferentes, pudiendo además existir la posibilidad de ser de diversas cepas de *Echinococcus granulosus*. La respuesta inmune se da contra determinadas fracciones proteicas,²⁰ siendo en un buen porcentaje de casos contra el antígeno B¹² y el antígeno 5;²⁷ los que a la vez se encuentran distribuidos en diferentes fracciones proteicas dentro del líquido hidatídico, pudiendo identificarse con diferentes patrones moleculares, dependiendo del antígeno utilizado.

En las figuras 4 a 9 se muestran las tiras de nitrocelulosa, las cuales presentan las bandas de reactividad en los diferentes pacientes con antígeno hidatídico humano (figuras 4 y 5), antígeno hidatídico bovino (figuras 6 y 7) y antígeno hidatídico ovino (figuras 8 y 9); mientras que en los cuadros I y II se presentan los patrones de reactividad según el patrón de masas moleculares utilizado en los pacientes hidatídicos y no hidatídicos respectivamente; asimismo, en los cuadros III y IV se observa el patrón de reactividad con antígeno bovino y en los cuadros V y VI con antígeno ovino.

Cuadro I. Patrón de reactividad de bandas detectadas por inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico humano de los pacientes con hidatidosis.

Muestra	Masas moleculares (kDa)													Diagnóstico
	93	95	97	97-66	66	45	43	41	40	38	31	21-31	21	
1	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
3	X				X			X		X	X		X	Hidatidosis
4	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X		X	Hidatidosis
5	X	X			X				X	X	X		X	Hidatidosis
6	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X		X	Hidatidosis
7	X	X	X	X		X			X	X	X	X	X	Hidatidosis
8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
9	X	X				X			X	X	X	X	X	Hidatidosis
10	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
11	X	X	X	X		X		X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
12	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	Hidatidosis
13	X	X	X	X		X				X	X	X	X	Hidatidosis
14	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
15	X	X	X	X	X	X		X		X	X	X	X	Hidatidosis
16	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
17	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
18	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
19	X	X				X			X	X	X	X	X	Hidatidosis
20	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
21	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
22	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
23	X	X				X				X	X	X	X	Hidatidosis
24	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
25	X	X	X			X			X	X	X	X	X	Hidatidosis
26	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
27	X	X	X	X		X		X		X	X	X	X	Hidatidosis
28	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
29	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
30	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
31	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
32	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
33	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
34		X				X			X		X	X	X	Hidatidosis
35		X				X			X		X	X	X	Hidatidosis
36		X				X			X		X	X	X	Hidatidosis
37	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
38	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Hidatidosis
39	X	X	X	X		X			X	X	X	X		Hidatidosis
40	X	X	X	X		X			X	X	X	X		Hidatidosis

En las figuras y cuadros mencionadas anteriormente se puede observar que, cuando se utiliza antígeno hidatídico humano, la cantidad de bandas de reactividad en los pacientes con hidatidosis son

hasta 13; mientras que con antígeno bovino son hasta nueve y con antígeno ovino son ocho. Sin embargo, en los pacientes no hidatídicos se puede observar que existe mayor reactividad de bandas

Cuadro II. Patrón de reactividad de bandas detectadas por inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico humano de los pacientes no hidatídicos.

Muestra	Masas moleculares (KDa)												Diagnóstico	
	93	95	97	97-66	66	45	43	41	40	38	31	21-31	21	
41	X	X	X			X			X		X	X	X	LES. Anti DNA+
42	X	X	X			X			X		X	X	X	Carcinoma hepatocelular
43	X	X	X			X			X		X	X	X	Quiste seroso
44	X	X	X			X			X		X	X	X	Quiste simple
45	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Quiste simple
46	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Quiste simple
47	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Cisticercosis
48	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Cisticercosis
49	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X	Cisticercosis
50	X	X	X			X			X		X	X	X	Toxoplasmosis
51	X	X	X			X			X		X	X	X	Toxoplasmosis
52	X	X	X			X			X		X	X	X	Toxoplasmosis
53	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Leishmaniasis
54	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Leishmaniasis
55	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Chagas
56	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Chagas
57	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Fascioliasis
58	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Fascioliasis
59	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	<i>Malaria vivax</i>
60	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	<i>Malaria falciparum</i>
61	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Sano
62	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Sano
63	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Sano
64	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Sano
65	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Sano
66	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X	Sano
67	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Sano
68	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Sano
69	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Sano
70	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	Sano
71	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Sano
72	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Sano
73	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Sano
74	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Sano
75	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Sano
76	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	Sano
77	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	Sano
78	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Sano
79	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Sano
80	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	Sano

con antígeno humano, que con antígeno bovino y ovino. Hallazgos que indican que, si bien el antígeno hidatídico humano presenta mayor cantidad de bandas con posibilidad de ser bandas diagnósticas,

los pacientes sin hidatidosis también muestran algunas de esas bandas, lo que resta la posibilidad de poder encontrar una banda diagnóstica con buena sensibilidad y especificidad.

Cuadro III. Patrón de reactividad de bandas detectadas por inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico bovino de los pacientes con hidatidosis.

Muestra	Masas moleculares (KDa)										Diagnóstico
	97	97-66	66	45	43	40	38	35	21-31		
1	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
2	x	x	x	x		x	x	x			Hidatidosis
3			x								Hidatidosis
4	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
5	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
6	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
7	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
8	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
9	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
10	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
11	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
12	x	x	x	x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
13	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
14	x	x	x	x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
15	x	x	x	x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
16	x	x	x	x	x	x	x	x			Hidatidosis
17	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
18	x	x	x	x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
19			x								Hidatidosis
20	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
21	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
22	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
23	x	x	x		x	x	x	x			Hidatidosis
24	x	x		x	x	x					Hidatidosis
25	x	x			x						Hidatidosis
26	x	x	x	x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
27	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
28	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
29	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
30	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
31	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
32	x	x		x	x	x					Hidatidosis
33	x	x		x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
34			x								Hidatidosis
35			x								Hidatidosis
36			x								Hidatidosis
37	x	x	x	x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
38	x	x	x	x	x	x	x	x		x	Hidatidosis
39											Hidatidosis
40											Hidatidosis

Lo ideal de una prueba de inmunoblot sería que presentase muchas bandas en los pacientes con la enfermedad y ninguna banda en los sujetos sanos o con otras enfermedades; hecho que prácticamente no se ve y menos aún en nuestro medio en el que la prevalencia de otras parasitosis es alta,

Cuadro IV. Patrón de reactividad de bandas detectadas por inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico bovino de los pacientes no hidatídicos.

Muestra	Masas moleculares (KDa)										Diagnóstico
	97	97-66	66	45	43	40	38	35	21-31		
41	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	LES. Anti DNA +
42	x	x									Carcinoma hepatocelular
43	x	x									Quiste seroso
44	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	Quiste simple
45	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Quiste simple
46	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Quiste simple
47	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Cisticercosis
48	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	Cisticercosis
49	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Cisticercosis
50	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Toxoplasmosis
51	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Toxoplasmosis
52	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	Toxoplasmosis
53	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Leishmaniasis
54	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Leishmaniasis
55	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Chagas
56	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	Chagas
57	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	Fascioliasis
58	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	Fascioliasis
59	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	<i>Malaria vivax</i>
60	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	<i>Malaria falciparum</i>
61				x							Sano
62			x		x						Sano
63			x								Sano
64			x								Sano
65			x								Sano
66			x		x						Sano
67			x								Sano
68			x								Sano
69			x								Sano
70			x								Sano
71			x								Sano
72			x		x					x	Sano
73	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	Sano
74	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	Sano
75			x								Sano
76			x								Sano
77			x								Sano
78			x								Sano
79			x	x							Sano
80			x								Sano

Cuadro V. Patrón de reactividad de bandas detectadas por inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico ovino de los pacientes con hidatidosis.

Muestra	Masas moleculares (KDa)										Diagnóstico
	97	97-66	66	45	43	40	38	21-31	21		
1	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
2	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
3			x	x	x	x	x				Hidatidosis
4	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
5	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
6	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
7	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
8	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
9	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
10	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
11	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
12	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
13	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
14	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
15	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
16	x	x	x		x		x				Hidatidosis
17	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
18	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
19	x	x	x	x	x	x	x				Hidatidosis
20	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
21	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
22	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
23	x	x	x	x	x	x	x				Hidatidosis
24	x	x	x	x	x	x	x				Hidatidosis
25			x	x							Hidatidosis
26	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
27	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
28	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
29	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
30	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
31	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
32	x	x	x	x	x	x	x				Hidatidosis
33	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
34	x	x	x	x	x	x	x				Hidatidosis
35			x	x							Hidatidosis
36	x	x	x	x	x	x	x	x			Hidatidosis
37	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
38	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis
39	x	x	x	x	x	x	x				Hidatidosis
40	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Hidatidosis

84

sobre todo la cisticercosis, parásito que comparte varios componentes antigenicos con el quiste hidatídico.⁴

Cuadro VI. Patrón de reactividad de bandas detectadas por inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico ovino de los pacientes no hidatídicos.

Muestra	Masas moleculares (KDa)										Diagnóstico
	97	97-66	66	45	43	40	38	21-31	21		
41				x	x			x	x	LES. Anti DNA +	
42				x						Carcinoma hepatocelular	
43				x						Quiste seroso	
44				x	x			x	x	Quiste simple	
45				x						Quiste simple	
46				x						Quiste simple	
47	x			x						Cisticercosis	
48		x		x	x	x	x	x	x	Cisticercosis	
49				x						Cisticercosis	
50	x	x	x	x	x	x	x	x	x	Toxoplasmosis	
51				x						Toxoplasmosis	
52				x						x Toxoplasmosis	
53	x			x	x	x	x	x	x	Leishmaniasis	
54				x		x	x	x	x	Leishmaniasis	
55				x						Chagas	
56	x			x	x	x	x	x	x	x Chagas	
57	x			x	x	x	x	x	x	x Fascioliasis	
58				x						Fascioliasis	
59				x						Malaria vivax	
60				x		x	x	x	x	Malaria falciparum	
61				x		x	x	x	x	Sano	
62				x		x	x	x	x	Sano	
63				x		x	x	x	x	Sano	
64	x	x	x	x	x	x	x	x	x	Sano	
65			x	x	x	x	x	x	x	Sano	
66			x	x	x	x	x	x	x	Sano	
67											Sano
68			x	x	x	x	x	x	x	Sano	
69			x	x	x	x	x	x	x	Sano	
70			x	x	x	x	x	x	x	Sano	
71	x	x	x	x	x	x	x	x	x	Sano	
72		x	x	x	x	x	x	x	x	x Sano	
73		x	x	x	x	x	x	x	x	Sano	
74		x	x	x	x	x	x	x	x	Sano	
75		x	x	x	x	x	x	x	x	Sano	
76		x	x	x	x	x	x	x	x	Sano	
77		x	x	x	x	x	x	x	x	Sano	
78		x	x	x	x	x	x	x	x	Sano	
79		x	x	x	x	x	x	x	x	Sano	
80		x	x	x	x	x	x	x	x	Sano	

La banda diagnóstica se obtiene al observar el grupo de enfermos hidatídicos y el grupo de pa-

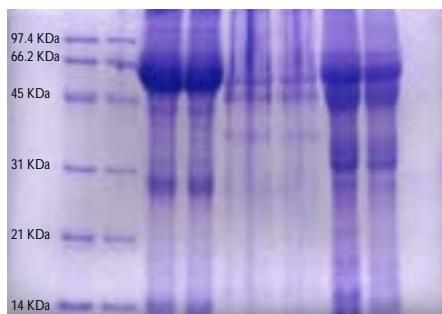


Figura 1. Caracterización proteica del antígeno hidatídico humano con diferentes concentraciones en relación al patrón de masas moleculares.

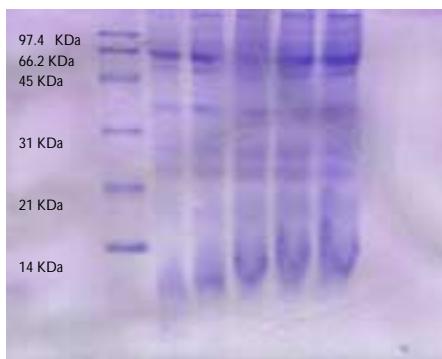


Figura 2. Caracterización proteica del antígeno hidatídico ovino con diferentes concentraciones en relación al patrón de masas moleculares.

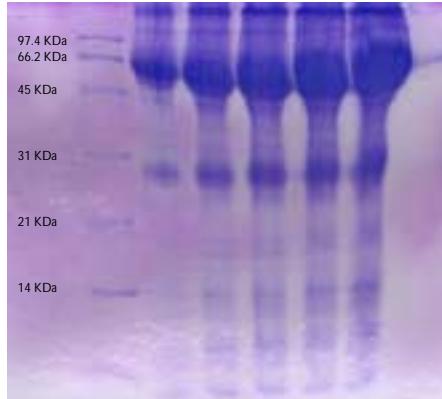


Figura 3. Caracterización proteica del antígeno hidatídico bovino con diferentes concentraciones en relación al patrón de masas moleculares.

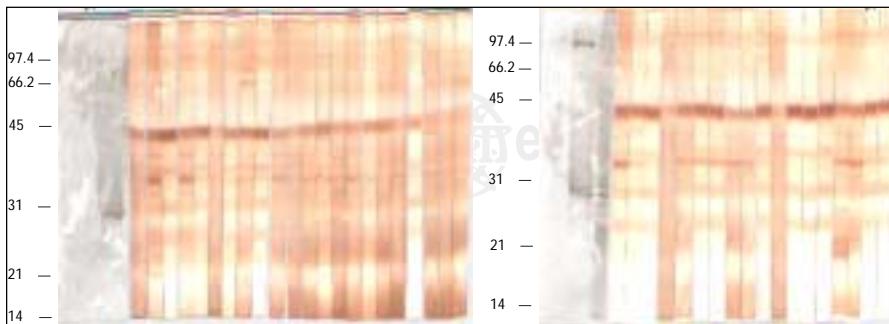


Figura 4. Patrón de reactividad de la prueba de inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico humano de los pacientes con hidatidosis.

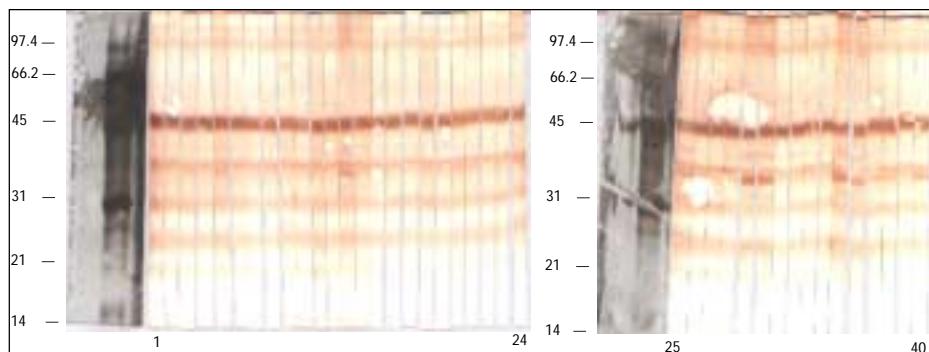


Figura 5. Patrón de reactividad de la prueba de inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico humano de los pacientes no hidatídicos.

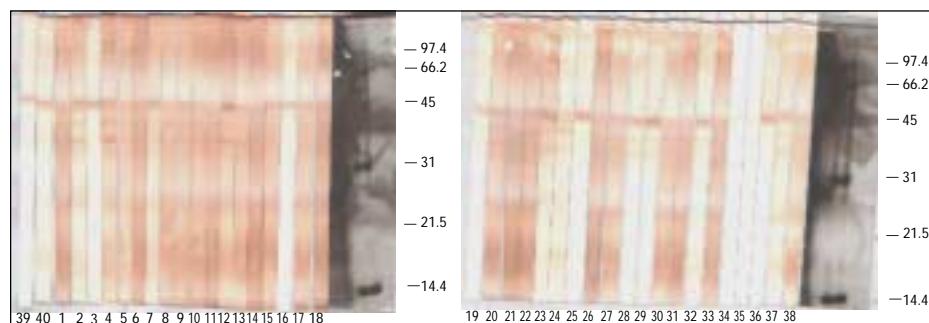


Figura 6. Patrón de reactividad de la prueba de inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico bovino de los pacientes con hidatidosis.

86

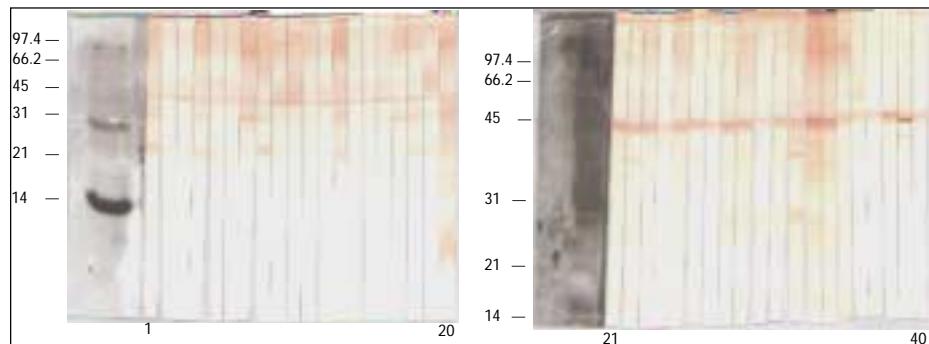


Figura 7. Patrón de reactividad de la prueba de inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico bovino de los pacientes no hidatídicos.

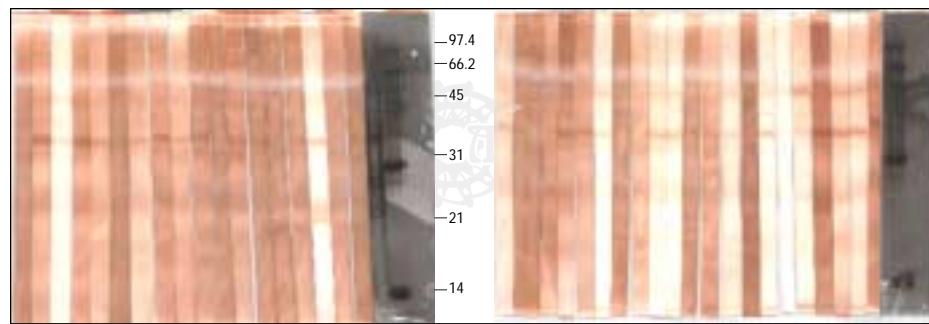


Figura 8. Patrón de reactividad de la prueba de inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico ovino de los pacientes con hidatidosis.

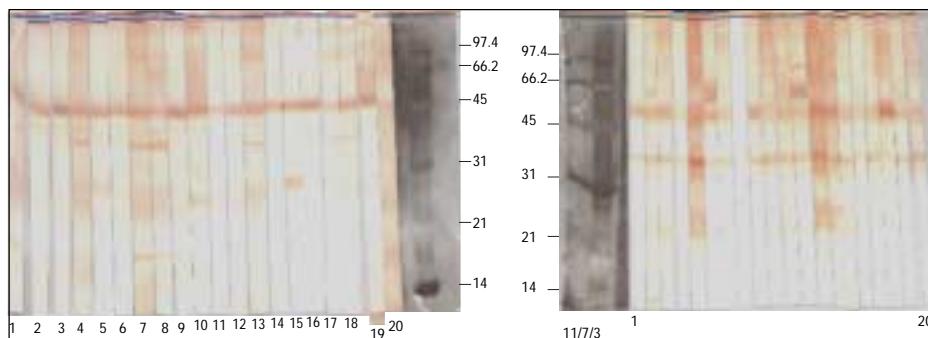


Figura 9. Patrón de reactividad de la prueba de inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico ovino de los pacientes no hidatídicos.

Diferentes autores como González,²⁷ Shambesh,³² Leggatt^{31,32} y Siracusano¹⁴ señalan otras bandas diagnósticas que difieren de las encontradas en el presente estudio. Esto indica que cada población debe tener sus propios estudios para determinar sus bandas diagnósticas en relación a sus antígenos y las diferentes prevalencias de otras enfermedades, ya que ésta es la única manera de evaluar una prueba para una determinada realidad.

Los hallazgos del presente estudio confirman las observaciones realizadas en el pasado,¹⁹ ya que se pudo observar que, cuando las placas de ELISA se sensibilizaban con antígeno de quiste hidatídico humano, las reacciones eran muy fuertes dando densidades ópticas muy elevadas, correlacionándose con la mayor reactividad de bandas en la prueba de inmunoblot con el antígeno humano. Sin embargo, cuando se corrían sueros de pacientes con otras enfermedades o personas sanas, las densidades ópticas no eran tan elevadas, permitiendo dar un margen muy amplio para el *Cutt-off* de la prueba, lo que no sucedía con el antígeno ovino. No obstante, en el presente estudio no se ha podido demostrar que la prueba de inmunoblot con antígeno hidatídico humano sea mejor que la prueba de inmunoblot con antígeno hidatídico ovino o bovino.

En los cuadros 7, 8 y 9 se presentan los datos obtenidos del teorema de Bayes para las bandas de los diferentes antígenos. Se puede observar que la prueba con antígeno humano presenta menor valor diagnóstico que las pruebas con antígeno ovino y bovino.

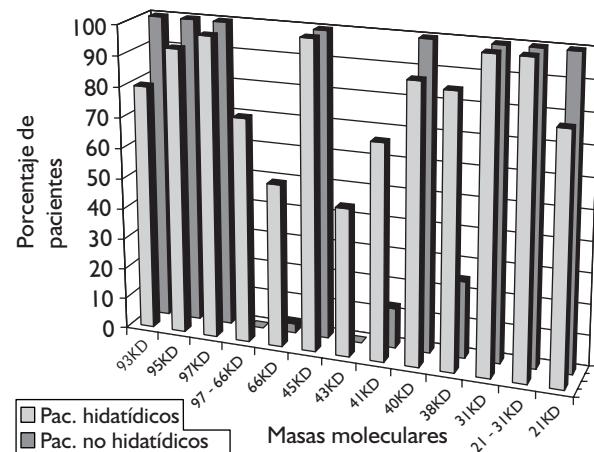


Figura 10. Frecuencia de reactividad de bandas detectadas por la prueba de inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico humano en pacientes con y sin hidatidosis.

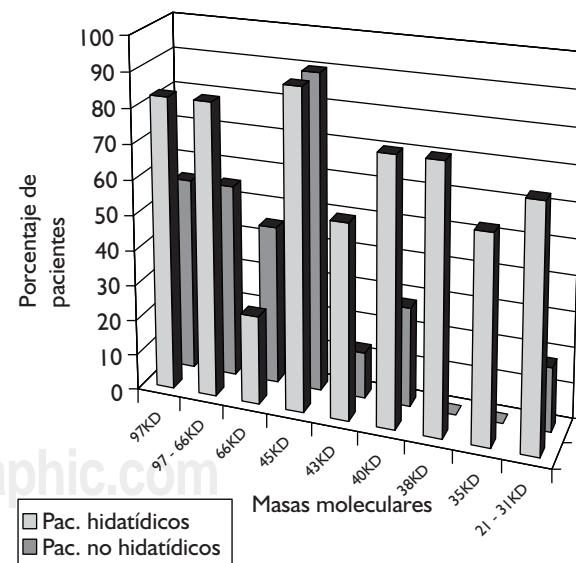


Figura 11. Frecuencia de reactividad de bandas detectadas por la prueba de inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico bovino en pacientes con y sin hidatidosis.

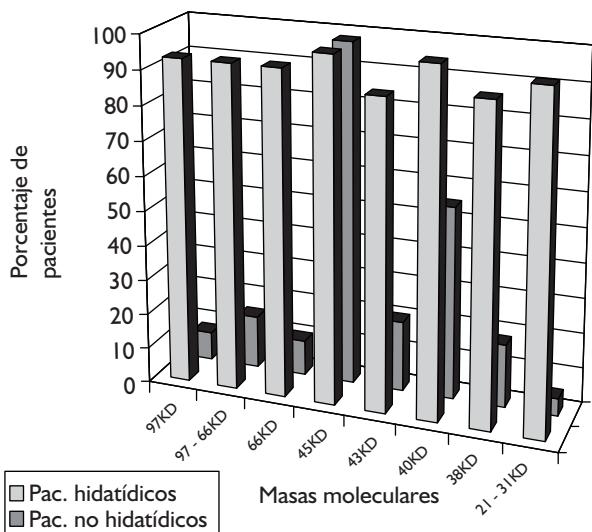


Figura 12. Frecuencia de reactividad de bandas detectadas por la prueba de inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico ovino en pacientes con y sin hidatidosis.

Cuadro VII. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la prueba de inmunoblot con la banda de 38 KDa del antígeno hidatídico humano.

	Enfermedad hidatídica	No hidatídicos
Prueba positiva	35	10
Prueba negativa	5	30
Sensibilidad	88%	
Especificidad	75%	
Valor predictivo positivo	78%	
Valor predictivo negativo	100%	

Conclusiones

La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la prueba de inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico humano con la banda de 38 KDa, es de 88, 75, 78 y 100%, respectivamente.

La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la prueba

Cuadro VIII. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la prueba de inmunoblot con la banda de 38 KDa del antígeno hidatídico bovino.

	Enfermedad hidatídica	No hidatídicos
Prueba positiva	30	0
Prueba negativa	10	40
Sensibilidad	75%	
Especificidad	100%	
Valor predictivo positivo	100%	
Valor predictivo negativo	100%	

Cuadro IX. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la prueba de Inmunoblot con la banda de 21-31 KDa del antígeno hidatídico ovino.

	Enfermedad hidatídica	No hidatídicos
Prueba positiva	38	2
Prueba negativa	2	38
Sensibilidad	95%	
Especificidad	95%	
Valor predictivo positivo	95%	
Valor predictivo negativo	100%	

de inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico bovino con la banda de 38 KDa, es de 75, 100, 100 y 100%, respectivamente.

La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la prueba de inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico ovino con la banda de 21-31 KDa, es de 95, 95, 95 y 100%, respectivamente.

El valor diagnóstico de la prueba de inmunoblot, utilizando antígeno hidatídico humano, es menor que empleando antígeno hidatídico ovino y bovino.

Recomendaciones. 1) No utilizar el antígeno hidatídico humano como antígeno para el diagnós-

tico serológico de hidatidosis. 2) Continuar usando el antígeno hidatídico ovino para realizar la prueba de inmunoblot para el diagnóstico de hidatidosis.

Referencias

1. Fernández H. *Perspectivas para la eliminación de la hidatidosis en el Cono Sur. XII Reunión Interamericana a nivel ministerial en Salud y Agricultura*. OMS, OPS. 2001.
2. Schenone H. Human hydatidosis in Chile. Seroprevalence and estimate of the number of infected people. *Bol Chil Parasitol* 1999; 54: 70-73.
3. Náquira C. Epidemiología de la hidatidosis en el Perú 1989. *Anales del seminario nacional de zoonosis y enfermedades de transmisión alimentaria*. Perú: Editorial EIRL, 1989.
4. Atias A. *Parasitología clínica*. Santiago de Chile: Editorial Mediterráneo, 1991.
5. Mohammad S. Percutaneous drainage compared with surgery for hepatic hydatid cysts. *New Engl J Med* 1997; 337: 881-887.
6. Larrieu E. Asymptomatic carriers of hydatidosis: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Rev Panam Sal Pub* 2000; 8 (4): 250-256.
7. Krige JE. ABC of abscesses and Hydatid Disease. *BMJ* 2001; 332: 537-540.
8. Ramos G. Hydatid cyst of the lung: Diagnosis and treatment. *World J Surg* 2001; 25(1): 46-57.
9. Vildosola H. Albendazol en quiste hidatídico. *Invest Med Inter* 1991; 15 (suppl 1): 12-16.
10. Grimm F. Analysis of specific immunoglobulin G subclass antibodies for serological diagnosis of echinococcosis by standard enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diag Labor Immunol* 1998; 5: 613-616.
11. Daeki AO. IgG-subclass antibody responses and the natural history of hepatic cystic echinococcosis in asymptomatic patients. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94: 319-328.
12. Rigaño R. Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infect Immun* 2001; 69: 288-296.
13. Kanwar JR. Isolation & immunochemical characterization of diagnostically relevant antigens of *Echinococcus granulosus*. *Indian J Med Res* 1993; 97: 75-82.
14. Siracusano A. Detection of antibodies against *Echinococcus granulosus* major antigens and their subunits by immunoblotting. *Transm Res Soc Trop Med Hyg* 1991; 85 (2): 239-243.
15. Liance M. Immunodiagnosis of *Echinococcus* infection: Confirmatory testing and species differentiation by a new commercial western blot. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3718-3721.
16. Ito A. Differential serodiagnosis for cystic and alveolar echinococcosis using fractions of *Echinococcus granulosus* cyst fluid (antigen B) and *E. multilocularis* protoscoleces (EM18). *Ame J Trop Med Hyg* 1999; 60(2): 188-192.
17. Coltorti EA. Detection of antibodies against *Echinococcus granulosus* arc 5 antigens by double diffusion test. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1978; 72: 12-15.
18. Parija SC. Enhancement of sensitivity of the haemagglutination test for echinococcosis by use of *Staphylococcus aureus* protein A. *Med Microbiol* 1986; 22: 241-244.
19. Gómez TJC. Coaglutinación (Co-A), ELISA e inmunoblot en el diagnóstico de hidatidosis humana. *XIX Congreso Internacional de Hidatidología, San Carlos de Bariloche-Argentina*, 1997.
20. Kharebav A. Cellular and humoral immune responses of hydatidosis patients to *Echinococcus granulosus* purified antigens. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57 (5): 619-625.
21. Irabuena O. Characterization and optimization of Bovine *Echinococcus granulosus* cyst fluid to be used in immunodiagnosis of hydatid disease by ELISA. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2000; 42: 255-262.
22. Guerrí ML. Utility of IgG subclasses in the diagnosis and follow up of hydatidosis. *Enf Infect Microbiol Clin* 2000; 18 (6): 262-266.
23. Coltorti EA. Standardization and evaluation of an enzyme immunoassay as a screening test for the seroepidemiology of human hydatidosis. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 35 (5): 1000-1005.
24. Gadea I. Immunological diagnosis of human hydatid cyst relapse: Utility of the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot and discriminant analysis. *Clin Diag Labor Immunol* 2000; 7: 549-552.
25. Ortona E. Native and recombinant antigens in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Paras Immunol* 2000; 22 (11): 553-559.
26. Robert-Gangneux F. Comparative value of 2 western blot techniques for confirmation of hydatidosis diagnosis. *Bull Soc Pathol* 1999; 92 (1): 13-17.
27. Gonzalez G. Molecular characterization of P-29, a metacestode-specific component of *Echinococcus granulosus* which is immunologically related to, but distinct from, antigen 5. *Molec Biochem Parasitol* 2000; 105 (2): 177-184.
28. Sbihi Y. Serologic recognition of hydatid cyst antigens using different purification methods. *Diag Microbiol Infect Dis* 1996; 24 (4): 205-211.
29. Ferreira HB. Expression and analysis of the diagnostic value of an *Echinococcus granulosus* antigen gene clone. *Intern J Parasitol* 1994; 24 (6): 863-870.
30. Leggatt GR. Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in *Echinococcus granulosus* cyst fluid by immunoblot analysis. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 86 (2): 189-192.
31. Leggatt GR. Identification and diagnostic value of a major antibody epitope on the 12 kDa antigen from *Echinococcus granulosus* (hydatid disease) cyst fluid. *Parasite immunology* 1994; 16 (2): 87-96.
32. Shambesh MK. Immunoblot evaluation of the 100 and 130 kDa antigens in camel hydatid cyst fluid for the serodiagnosis of human cystic echinococcosis in Libya. *Transm Res Soc Trop Med Hyg* 1995; 89(3): 276-279.
33. Shapiro SZ. Analysis of host components in hydatid cyst fluid and Immunoblot diagnosis of human *Echinococcus granulosus* infection. *Ann Trop Med Parasitol* 1992; 86(5): 503-509.
34. Gadea I. Immunological diagnosis of human cystic echinococcosis: Utility of discriminant analysis applied to de enzyme-linked immunoelectrotransfer blot. *Clin Diag Lab Immunol* 1999; 6: 504-508.
35. Gonzalez-Sapienza G. 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: 3979-3983.