

Evaluación de las técnicas de doble difusión 5 e inmunoelectroforesis en hidatosis infantil en la casuística de un decenio

Clara Retamal G.¹; Carlos Pérez B.¹; Isabel Noemí H.¹;
Ximena Aguilera M.¹; Werner Apt B.¹

Ten years experience with serum double diffusion 5 and immune electrophoresis methods in the diagnosis of infantile echinococcosis

From year 1982 throughout 1991, double diffusion 5 and immune electrophoresis were applied to 500 sera from symptomatic children suspected of hydatid disease and from 70 controls affected by other confirmed parasitic diseases. One or more hydatid cysts were confirmed by surgery in 115 children. Double diffusion 5 and immune electrophoresis gave positive results in 78 cases (67.8%) and suspicious reactions in 16 (13.9%). The highest sensitivity (47.4%) was associated to hepatic location of cysts. Arc 5 was identified in 33.9% sera of confirmed cases and in 35/42 broken cysts. In 35/115 confirmed cases (30.4%) two bands were identified at double diffusion and immune electrophoresis, so the detection of arc 5 or two or more precipitation bands in these tests was considered to be a positive criterium. Tests positive predictive value was 100% and their negative predictive value was 92.5%, confirming that negative serological results should not exclude hydatidosis.

{Key words: echinococcosis, hydatidosis, serodiagnosis.}

En Chile la hidatidosis es una zoonosis parasitaria importante, con prevalencia estimada de 7 por 100 000 habitantes, e incidencia clínica superior a 800 casos por año^{1,2}, de los cuales aproximadamente 20% se manifiestan en niños. Entre las técnicas aplicadas a su diagnóstico destacan la hemaglutinación indirecta (HAI), aglutinación de látex (AL), inmunofluorescencia indirecta (IFI) e inmunoprecipitación (IP), con variados rendimientos en adultos y niños^{3,4}. Cada laboratorio, asistencial o de investigación, utiliza la que le resulte más fácil en su medio, siempre que sea sensible y específico. Se sabe que ambas propiedades dependen de factores biológicos inherentes al huésped, al parásito (edad, localización, características del quiste, especie, etc.) y, además, de factores técnicos como calidad y origen de los antígenos utilizados, los que deben ser estandarizados en cada centro especializado^{4,5}. Si bien en los últimos años

otras técnicas, como ELISA^{6,7} e inmunoelectrotransferencia, complementan el diagnóstico, las de IP, doble difusión (DD5) e inmunoelectroforesis (IEF), siguen constituyendo un valioso aporte al laboratorio asistencial. En este trabajo retrospectivo se describe la experiencia de una década con el rendimiento de la DD5 y de la IEF en el diagnóstico de la hidatosis en pediatría.

Material y Método

Se efectuaron pruebas de DD5 e inmunoelectroforesis en 570 muestras de niños menores de 15 años, provenientes de hospitales pediátricos de las áreas Norte, Oriente y Sur de Santiago: 500 niños cuyo diagnóstico clínico probable era hidatosis y 70 con otras parasitosis confirmadas (ascariasis, tricocefalosis, fascioliasis, toxocariasis, amebiasis y giardiasis). De los 500 niños sintomáticos estudiados, en 115 se confirmó el diagnóstico en una intervención quirúrgica: 60 varones (52,2%) y 55 niñas (47,8%), de 5 a 14 años de edad, promedio 8 años 6 meses.

El antígeno soluble empleado en las técnicas fue preparado y estandarizado como ha sido previamente descrito^{3,4}, a partir de líquido hidatídico de quistes hepáticos y pulmonares de origen ovino de la XI región de Chile y del área

1. Departamento de Parasitología, Unidades Sur y Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

metropolitana, centrifugado, dializado, liofilizado y, posteriormente, guardado en frascos estériles hasta su empleo, previa reconstitución en solución tampón. El contenido de nitrógeno total osciló entre 0,6 y 0,9 mg/ml y el antígeno obtenido presentó entre 9 y 11 arcos de precipitación en la inmunoelectroforesis, incluyendo arco 5. Para la estandarización de esta técnica se emplearon dos grupos de sueros controles: sueros positivos con 7 o más bandas de precipitación además del arco 5, provenientes de pacientes adultos con hidatidosis múltiple y sueros de pacientes (niños) que poseían no más de 2 bandas con arco 5. Como control de la DD5 se emplearon sueros positivos confirmados con arco 5.

Las pruebas se practicaron en láminas portaobjeto corrientes, con agarosa 1% como soporte. El antígeno liofilizado se utilizó en concentración de 100 mg/ml, diluido en tampón salino, fosfato (PBS), pH 7,4 y posteriormente las muestras fueron teñidas con colorante rojo Ponceau o amido Schwarz para mejor visualización de las bandas. El criterio de positividad para DD5 e inmunoelectroforesis fue la presencia del arco 5 o, en su ausencia, la detección de 2 o más bandas o arcos de precipitación, con identidad perfecta con cualquier banda del suero control. La presencia de sólo una banda que no correspondiese al arco 5 fue considerada resultado sospechoso de infección hidatídica.

Resultados

De los 115 casos confirmados quirúrgicamente, en 78 (67,8%) la serología fue positiva a la DD5 y a la inmunoelectroforesis. En 16 (13,9%) casos fue sospechosa, por presentar sólo una banda de precipitación que no correspondía al arco 5; los sueros que presentaron una banda fueron incorporados dentro del grupo de negativos (sospechosos), sin embargo en todos (n:16) se confirmó, posteriormente, infección hidatídica, correspondiendo 13 a quistes intactos y 3 a quistes infectados. En 21 sueros (18,3%) las reacciones resultaron negativas con ambas técnicas. La localización clínica más frecuente fue pulmonar, seguida de hepática, hepatopulmonar, peritoneal y otras mucho más raras. La mayor proporción de resultados positivos serológicos se detectó en hidatidosis hepática y la hepatopulmonar seguidas de la peritoneal y la pulmonar. En otras 5 localizaciones poco frecuentes (2 óseas, una esplénica, una parotídea y una renal), hubo 3 sospechosos y 2 negativos (tabla 1).

La proporción de positividad en relación al estado biológico de los quistes fue más alta en los recientemente rotos (97,6%) y menor en los intactos (40,0%). Se detectó arco 5 en 39 de los pacientes confirmados (33,9%), treinta y cinco

con quistes recientemente rotos y cuatro con quistes infectados (tabla 2).

El número de bandas o arcos de precipitación visualizados en las láminas teñidas fue de tres o mayor en 36,5% de los sueros, en 30,4% había dos bandas y en 14,8% sólo una; se encontró banda 5 única en el suero de un niño con hidatidosis hepática infectada (tabla 3). En el grupo control, compuesto por 70 sueros de niños con otras parasitosis, sólo se detectó una banda débil en la DD5 y negativa en la inmunoelectroforesis en una niña con tricocefalosis.

Comentario

La mayor frecuencia de la localización pulmonar en población infantil ha sido también constatada en publicaciones internacionales³ y es diferente de lo observado en adultos en nuestro país, donde prevalece la hepática. La sensi-

Tabla 1

Hidatidosis infantil. Rendimiento de las técnicas DD5 e IEF en 115 casos según localización

Localización	Casos		DD5 - IEF			
	n	%	Positividad n	%	Sospechosa n	%
Hepática	42	36,5	37	88,1	2	4,8
Pulmonar	47	40,9	25	53,2	10	21,3
Hepatopulmonar	12	10,4	10	83,3	1	8,3
Peritoneal	9	7,8	6	66,7	0	0,0
Otras localizaciones	5	4,4	0	00,0	3	60,0
Total	115	100,0	78	67,8	16	14,1

Tabla 2

Resultados de la DD5 e IEF según el estado biológico de los quistes y su relación con la presencia o ausencia de arco 5

Clasificación	Casos		DD5 - IEF				
	n	n	Positiva %	Con arco 5 n	%	Sin arco 5 n	%
Recientemente rotos	42	41	97,6	35	85,4	6	14,6
Infectados	33	21	63,6	4	19,0	17	80,9
Intactos	40	16	40,0	0	0,0	16	100,0
Total	115	78	67,8	39	50,0	39	50,0

Tabla 3

Hidatidosis infantil. Distribución de los pacientes según el número de bandas de precipitación observadas en DD5 e IEF

Pacientes		DD5 - IEF n de bandas
n	%	
21	18,3	0
17*	14,8	1
35	30,4	2
25	21,7	3
15	13,1	4
2	1,7	5 y más
115	100,0	Total

* Sólo en un caso informado positivo se observó el arco 5 como banda única, tanto en DD5 e IEF.

bilidad, expresada en mayor reactividad serológica en casos de quistes hepáticos, así como con el estado físico de las membranas (mayor en quistes rotos), es coincidente con otras experiencias^{9, 10}.

El arco 5 no fue observado en sueros de niños con quistes intactos (hialinos), posiblemente porque el componente antigénico, responsable de dicho arco, no filtre por las membranas intactas o, si lo hace, es en tan mínima concentración que no se logra detectarlo con estas técnicas.

De acuerdo con las normas del Centro Panamericano de Zoonosis, un buen antígeno debe presentar no menos de 7 arcos de precipitación, incluyendo el arco 5 y el B por inmunoelectroforesis para ser utilizado en inmunodiagnóstico de hidatidosis^{3, 4}. En los sueros estudiados se observaron entre 1 y 6 bandas y en los sueros controles entre 1 y 10, por lo tanto se estima que la visualización de una banda o arco, aunque no sea arco 5, correspondería a algún anticuerpo dirigido contra otro determinante antigénico contenido en el líquido hidatídico. Sin embargo, una banda debe ser considerada como resultado sospechoso de infección hidatídica, por la existencia de comunidades antigénicas con otros helmintos, hecho ya demostrado en adultos con hidatidosis complicada, ya que existe reacción cruzada con antígeno de *Cisticercus celulosae*¹¹, lo que no se observó en sueros de niños. En esta casuística no se detectaron falsos positivos con dos o más bandas, lo que fundamenta al criterio de positividad aplicado en este

estudio. Consideramos que los resultados deberían ser informados en términos de ausencia o presencia de anticuerpos antihidatídicos con o sin arco 5, indicándose el número de bandas encontradas en DD5 o inmunoelectroforesis, ya que esta información serviría al clínico para una evaluación más ponderada de la relación huésped-parásito.

Otros autores han obtenido una sensibilidad inferior empleando el criterio de positividad de tres o más bandas⁹⁻¹², pero no se ha descrito en cuántos sueros de pacientes con hidatidosis confirmada se observaron una o dos bandas o arcos de precipitación. Con respecto a la sensibilidad (67,8%) y especificidad (100%) observadas en este estudio, el valor predictivo positivo resultante fue 100% y el valor predictivo negativo 92,5%. Puesto que existen quistes serológicamente silentes, que suelen sospecharse por técnicas de imágenes, confirmados por cirugía¹³, los resultados negativos no descartan totalmente la presencia de hidatidosis. Además, al comparar la sensibilidad de las diferentes técnicas serológicas, las de inmunoprecipitación son capaces de detectar solamente entre 10 y 60 µg/ml de anticuerpos circulantes, en cambio ELISA detecta entre 0,01 y 0,001 µg/ml, lo que determina una sensibilidad significativamente mayor de esta última. Recomendamos estas pruebas en el diagnóstico de la hidatidosis en pediatría, por su especificidad, bajo costo y factibilidad en cualquier laboratorio asistencial, enfatizando el empleo de antígenos estandarizados, asociadas a otras pruebas como ELISA o HAI para complementar el diagnóstico clínico¹⁴.

Resumen

Entre 1982 y 1991 se aplicaron las técnicas DD5 e inmunoelectroforesis en 500 sueros de niños sintomáticos con sospecha de enfermedad hidatídica y 70 con otras parasitosis confirmadas. En 115 se comprobó quirúrgicamente uno o más quistes hidatídicos. La DD5 e inmunoelectroforesis resultaron positivas en 78 casos (67,8%) y sospechosas en 16 (13,9%). La localización hepática presentó la mayor sensibilidad (88,1%). El arco 5 se identificó en el 33,9% de los sueros confirmados y, de éstos, en 35 de 42 quistes rotos. Se consideró como criterio de positividad la presencia del arco 5 o, en su ausen-

cia, la detección de dos o más bandas de precipitación, fundamentando este criterio en el hecho que en 35 de los 115 casos confirmados quirúrgicamente (30,4%) identificamos dos bandas en la DD5 e inmunoelectroforesis y no detectamos falsos positivos con más de una banda.

(**Palabras clave:** hidatidosis, diagnóstico serológico, arco 5, inmunoelectroforesis.)

Referencias

1. *Serra I, Reyes H:* Hidatidosis humana en cuatro países de Sudamérica. *Bol of Sanit Panam* 1989; 106: 527-530.
2. *Schenone H, Rojas A, Villarroel F, Schenone H (hijo):* Algunos aspectos de la epidemiología de la hidatidosis humana y animal en Chile, con especial referencia al decenio 1975-1984. *Bol Chil Parasit* 1987; 42: 49-58.
3. *Varela-Díaz V, Coltorti E:* Técnicas para el diagnóstico inmunológico de la hidatidosis humana. OPS/OMS. Centro Panamericano de Zoonosis, 1974.
4. *Coltorti E, Varela D:* Detection of antibodies against *Echinococcus granulosus* arc 5 antigens by double diffusion test. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 72: 226-229.
5. *Pezzella M, Galli C, Vullo V, Zennaro F, Delia S, Sorice F:* *Echinococcus granulosus* antigens: comparative analysis of human, bovine and ovine hydatid fluids. *Ann Trop Med Parasitol* 1984; 78: 549-551.
6. *Coltorti E:* Standardization and evaluation of an enzyme immunoassay. A screening test for the seroepidemiology of human hydatidosis. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35: 100-105.
7. *Rickard M, Honey R, Brumley J, Mitchell G:* Serological diagnosis and post-operative surveillance of human hydatid disease. II The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using various antigens. *Pathology* 1984; 16: 211-215.
8. *Berchi J, Cano I, Díaz J, Cuadros A, Gómez F:* Hidatidosis en la infancia: Nuestros planteamientos actuales. XIII Congreso Internacional de Hidatidología. Libro de Ponencias. Madrid-España, del 24 al 27 de abril 1985; 222-226.
9. *Mercado R, Atías A, Astorga B, Lorca B:* Reacción de doble difusión en agar con detección del arco 5 en el diagnóstico de la hidatidosis. *Bol Of Sanit Panam* 1988; 105: 159-163.
10. *Yarzabal L, Retamal C, Sepúlveda R, Guachalla J, Kieguel C:* Aplicación de la inmunoelectroforesis al diagnóstico de la hidatidosis pulmonar en Chile. *Rev Inst Med Trop. São Paulo* 1975; 17: 263-268.
11. *Shepherd J, Mc Manus D:* Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Mol Biochem Parasitol* 1987; 25: 143-154.
12. *Lorca M, Denegri M, García A, Silva B:* Inmunodiagnóstico de hidatidosis humana. *Parasitol al Día* 1993; 17: 25-29.
13. *Varela-Díaz V, Guarnera E, Coltorti E:* Ventajas y limitaciones de los métodos inmunológicos y de detección por imágenes para el diagnóstico de la hidatidosis. *Bol Of Sanit Panam* 1986; 100: 369-383.
14. *Bonifacio R:* Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay: Seroprevalence of *Echinococcus granulosus* infection in a Uruguay rural human population. *Trans R Soc Trop Med Hyg Tropical* 1991; 85: 769-772.