

INMUNOGLOBULINAS ESPECÍFICAS EN PACIENTES CON HIDATIDOSIS HEPÁTICA. UTILIDAD EN EL SEGUIMIENTO POSTOPERATORIO.

Pilar Schneeberger Hitschfeld⁽¹⁾, Juan Luis Peña Rehbein⁽¹⁾, Dr. Carlos Manterola Delgado⁽¹⁾⁽²⁾.

RESUMEN

Objetivo: Determinar la utilidad de las inmunoglobulinas específicas para hidatidosis en el seguimiento postoperatorio de HH. **Material y método:** Cohorte concurrente. Se estudió una muestra aleatoria de 48 pacientes intervenidos por HH, con ELISA-IgG e ELISA-IgE preoperatorios positivos, controlados en el postoperatorio en forma clínica, de laboratorio, serología e imágenes anualmente durante cuatro años. **Resultados:** Comportamiento de inmunoglobulinas, respecto a negativización (neg): ELISA-IgE año 1: 77,7%; año 2: 80,7%; año 3: 94,7%; año 4: 100%. ELISA-IgG año 1: 24,2%; año 2: 29,6%; año 3: 25%; año 4: 44,4%.

Tabla 1.

Año	1	2	3	4
ELISA-IgE (% neg)	77.7	80.7	94.7	100.0
ELISA-IgG (% neg)	24.2	29.6	25.0	44.4

Además, un 12.5% de los pacientes viraron ELISA-IgG de negativo a positivo, en ausencia de recidiva.

Conclusión: Se constató un alto porcentaje de negativización de ELISA-IgE precozmente, aún cuando el 100% de ésta se alcanza tardíamente.

Se observó un comportamiento errático de ELISA-IgG, difícil de interpretar, que podría corresponder a falsos positivos. **Palabras claves:** serología, hidatidosis, seguimiento.

INTRODUCCIÓN

La hidatidosis es causada por el estado larval (hidátide) del cestodo *Echinococcus granulosus*, y es una de las mayores zoonosis en el mundo¹. En Chile, la hidatidosis es una zoonosis endémica, especialmente en la novena región, donde ha alcanzando una prevalencia de 18 a 48 casos por 100.000 habitantes².

El hombre, como huésped intermediario, desarrolla el estado larval, con una localización preferente a nivel hepático^{3,4}.

El diagnóstico de hidatidosis hepática se ha basado en tres pilares: el antecedente epidemiológico, las imágenes (especialmente la ecotomografía abdominal), y los estudios serológicos, entre los cuales podemos señalar DD₅, ELISA-IgE, ELISA-IgG, hemaglutinación y Western blott¹³. Sin embargo, el hecho de que la respuesta inmunológica en la hidatidosis es muy variable, hace que los resultados obtenidos en el diagnóstico serológico dependen de una serie de factores, como la técnica utilizada, la localización y el estado del quiste, etc.⁴⁻⁶. La prueba inmunológica ideal sería aquella que permitiera diagnosticar y diferenciar el

(1) Departamento de Cirugía.

(2) CIGES. Capacitación, Investigación y Gestión para la Salud Basada en Evidencia. Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

curso de la enfermedad de manera temprana después de un tratamiento médico o quirúrgico ⁷. El objetivo de este trabajo es determinar el comportamiento de la medición de inmunoglobulinas E y G, mediante técnica de ELISA, en sujetos a los cuales se les ha intervenido quirúrgicamente y extirpado la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODO

Diseño: Cohorte concurrente de sujetos intervenidos quirúrgicamente por hidatidosis hepática, a los que se practica mediciones repetidas de ELISA-IgE y ELISA-IgG.

Población: Pacientes intervenidos quirúrgicamente por hidatidosis hepática por el primer autor (CM), entre los años 1994 y 2003, en el servicio de cirugía del Hospital Regional de Temuco. Se realizó un muestreo simple por conveniencia, y se incluyeron pacientes con seguimiento con ELISA-IgE y ELISA-IgG para hidatidosis por al menos 48 meses, correspondiendo el tiempo cero al momento de la cirugía. Se excluyeron pacientes con hidatidosis en otra localización, otras lesiones quísticas abdominales, con enfermedades hepáticas crónicas ó insuficiencia orgánica concomitante.

Se consideró aquellos pacientes con quistes hidatídicos hepáticos resueltos tanto en forma electiva como de urgencia, independiente del número, tamaño o complicación.

De esta forma, se estudió a una población de 48 sujetos, 34 de género femenino (70.8%) y 14 masculino (29.2%); con una mediana de edad de 40.5 años (16 a 75 años).

Protocolo de estudio: Todos los pacientes tenían antecedente epidemiológico, habían sido valorados por medio de laboratorio general, radiología del tórax y ecotomografía abdominal. Se consideró como estándar de referencia para la confirmación

diagnóstica a la cirugía y anatomía patológica.

Diagnóstico serológico: Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de inmunología del Hospital Regional de Temuco. Las determinaciones se realizaron de la siguiente forma:

ELISA-IgE: Se utilizó como reactivo Rabbit antihuman IgE más PBS. Las muestras se refrigeraron por una noche y luego se lavaron con PBS Tween al 0.05%. La reacción se bloqueó con PBS/SAP al 2% por una hora, dejándolas a temperatura ambiente en la oscuridad, para después eliminar el excedente por volteo sin lavar. Luego se prepararon 2 tiras con 132 ml. más 1868 PBS, y una tira con 66 ml. más 934 PBS. Para preparar el suero, se diluyó éste con PBS tween al 0.05% (50 ml. de tween más 100 ml. de PBS). Se agregan 100 ml. del preparado y se incubó 3 hrs. a 37°C. Se lavó 5 veces con PBS tween al 0.05%. La conjugación se realizó con 1ml de IgE en 1 ml. de PBS tween, se incubó 1 hora y 30 minutos a 37°C y luego se lavó por 5 veces con PBS tween. El sustrato utilizado fue 100 ml. de TMB-DAKO por 10 minutos. Para detener la reacción se utilizó H²SO⁴.

ELISA-IgG: Se prepararon los pocillos con buffer coating (para 100 ml. se mezclan 0.159 grs. de Na₂CO₃ + 0.293 grs. de NaHCO₃ + 0.020 grs. de azidaNa, y se completa con agua destilada). Se tomaron 100 ml. de buffer más una pizca de IgG hidatídico, se colocó 100 ml. en cada pocillo y se refrigeró por 12 a 14 hrs. Al día siguiente, se lavaron las muestras con PBS Tween 0.05% por 6 veces. Se bloqueó con PBS al 2% por 1 hora a temperatura ambiente, se volteó y luego se congeló. Una vez descongelado, se lavó por una vez. Posteriormente se diluyó la muestra 1:200 con PBS Tween. Se incubó por 1 hora a 37°C y luego se lavó por 6 veces con PBS Tween. Para conjugar, se preparó 5 ul. de cory más 2,5 ml de PBS Tween, e incubó por una hora a 37°C. Se lavó por 6 veces, utilizando como sustrato 100 ul. de TBM por 5 a 10 minutos. Se

detiene la reacción con 100 ml. de H₂SO₄, y se leyó a 450 nm.

Seguimiento: Se aplicó un protocolo de seguimiento, que consideró control clínico, de laboratorio general y específico (incluyendo determinación de ELISA-IgE y ELISA-IgG) y ecotomografía abdominal a los 12, 24, 36 y 48 meses del postoperatorio.

Plan de análisis: Después de realizar un análisis exploratorio de los datos, se aplicó estadística descriptiva, con cálculo de porcentajes, medianas y valores extremos.

RESULTADOS

Se analizaron los datos según porcentaje de negativización, tal como se describe en la tabla 1. Con respecto a la IgE, se observó negativización en forma progresiva de las inmunoglobulinas, hasta alcanzar el 100% al cuarto año. Por el contrario, en IgG se observó un comportamiento errático con respecto a la negativización, con una disminución este porcentaje al tercer año, lo que se interpretó como positividad de muestras antes negativas, verificándose que un 12.5% de los pacientes viraron ELISA-IgG de negativo a positivo, en algún momento del seguimiento, en ausencia de imágenes quísticas radiológicas o ecotomográficas del tórax y el abdomen.

Tabla 2.

	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4
ELISA-IgE	77.7	80.7	94.7	100.0
ELISA-IgG	24.2	29.6	25.0	44.4

Tabla 1.

Año	1	2	3	4
ELISA-IgE (% neg)	77.7	80.7	94.7	100.0
ELISA-IgG (% neg)	24.2	29.6	25.0	44.4

Evolutividad de las inmunoglobulinas específicas a través del tiempo

DISCUSIÓN

Para el diagnóstico serológico de la hidatidosis se han empleado distintos métodos que han ido evolucionando con los años, desde la fijación del complemento hasta las actuales técnicas de ELISA o inmunotransferencia (*Western blot*). Los más usados han sido la contraímmuno-electroforesis o arco 5° de Capron, la hemaglutinación indirecta o prueba de látex⁸, siendo la primera la utilizada en nuestro trabajo.

La técnica de ELISA-IgG tiene una sensibilidad y especificidad descrita cercana a un 95%(15), pero en nuestro centro los valores son cercanos a 83% y 87% respectivamente.(16). Esto se debe a que la técnica tiene mayor rendimiento según la localización del quiste, siendo mayor en los quistes hepáticos; según el número de quistes, siendo mayor ante la presencia de dos o más (90% v/s 77%); según el tamaño del quiste, aumentando la sensibilidad en quiste mayor de 15 cm (85% v/s 80%); por último se observa una mayor sensibilidad en quistes multivesiculares comparado con univesiculares (88% v/s 80%)(16). Con respecto a la especificidad de IgG, esta descrito que existen reacciones cruzadas con otras parasitosis distintas a hidatidosis, lo que podría explicar los resultados erráticos descritos anteriormente.

La determinación de anticuerpos totales IgG parece bastante útil por ser sensible y específica, pero ciertos estudios determinan que las subclases de las inmunoglobulinas de tipo IgG nos proporciona información de mayor utilidad. En especial la subclase IgG₁ alcanza una gran sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de hidatidosis hepática, disminuyendo su sensibilidad y especificidad en la

hidatidosis extrahepática. Force et al⁹, estudiaron varios métodos, buscando aquel que permitiera llevar a cabo un seguimiento de los pacientes, encontrando que el mayor problema que plantean los distintos métodos diagnósticos es el tiempo que tardan en negativizarse. Cuando la IgE disminuye tras la cirugía indica buen pronóstico¹⁶, y un aumento de la misma va asociada a una progresión de la enfermedad, pero esta disminución suele observarse a partir de los 6 meses, pudiendo llegar a años en algunos casos. Otro inconveniente de la IgE es su falta de especificidad, ya que aparece elevada en otras parasitosis distintas de la hidatidosis y otros procesos no infecciosos, como cirrosis hepática y enfermedades malignas⁴.

La IgG₄ aparece también en otras parasitosis de larga duración, como esquistosomiasis, filariasis o estrombiloidiasis crónica¹, entre otras. La síntesis de IgG₄ por los leucocitos de sangre periférica depende de la producción de interleucina (IL)⁴. Rigano et al¹⁰, proponen la IL-4 para el seguimiento de los pacientes y encuentran que aquellos que responden al tratamiento producen significativamente menos IL-4 que aquellos que no responden. Esto implica una menor producción de IgG₄ y una menor producción de IgE.

Navarro-Zorraquino et al¹¹, en otro estudio, siguieron la evolución de pacientes con hidatidosis hepática y pulmonar tras la cirugía, midiendo los valores de IL-4, y encontraron resultados similares. La continua exposición antigénica a la que se encuentran sometidos los pacientes infectados por *E. granulosus* implica que la producción de IL-4 es elevada y, por tanto, la IgG₄ alcanza valores mayores. Cuando el quiste desaparece o se calcifica, la producción de antígenos parasitarios desciende hasta niveles indetectables, no hay producción de IL-4 y la IgG₄ disminuye hasta valores negativos. Ravinder¹² et al, midieron los valores de antígenos en suero de

pacientes afectados y encuentra que tras ser sometidos a intervenciones quirúrgicas las concentraciones de antígenos circulantes descienden gradualmente a partir del séptimo día, y desaparecen después del primer mes de la cirugía y del sexto mes de tratamiento farmacológico.

La subclase IgG₄ se negativiza si la evolución es favorable. Se positiviza en pacientes asintomáticos si estos sufren recaídas y se mantiene constante si la cirugía no ha sido completa.

Podemos sostener que la IgG₄ es un marcador eficaz para llevar a cabo un seguimiento de pacientes con hidatidosis y, junto a la subclase IgG₁, es útil en el diagnóstico de esta afección, pero tienen el inconveniente de la escasa disponibilidad de la prueba. Por el contrario las IgG estudiadas en nuestros pacientes, en especial la IgG total y IgE total, serían de gran utilidad en nuestro medio para el seguimiento de pacientes con hidatidosis hepática por su buena relación costo beneficio.

En conclusión, se constató un alto porcentaje de negativización de ELISA-IgE en el corto plazo, aún cuando el 100% de ésta se alcanza tardíamente. Se observó un comportamiento errático de ELISA-IgG, difícil de interpretar, que podría corresponder a falsos positivos.

REFERENCIAS

1. Schantz PM, 1991. Parasitic zoonoses in perspectiva. Int J Parasitol 321:161-170.
2. Gutiérrez R, Muñoz F, Oberg C, Ampuero F. Conclusiones de las II Jornadas nacionales de hidatidología. Revista Médica del Sur (Chile) 1991; 16:8-9.
3. Gottstein B, Reichen J, 2003. Echinococcosis/hidatidosis. Cook GC, Zumla A, eds. Manson's Tropical Diseases. London: W.B. Saunders, Elsevier Science Ltd., 1561-1582.

4. Corachán M. Enfermedades producidas por helmintos. Farreras Rozman. Medicina Interna. Barcelona, 1992; 2397-2405.
5. Capron A, Yarzabal L, Vernes A, Fruit J Le diagnostic immunologique a l'equinococcose humaine. Path Biol 1970; 18: 357-365.
6. Maddison SE, Slemend SB, Shantz PM A specific diagnostic antigen of Echinococcus granulosus with an apparent molecular weight of 8 KD. Trans Roy Soc Med Hyg 1989; 40: 337-383.
7. Zhanqing SH, Xinhua F, Zhongxi Q, Ruilin L, Chunrong Y Application of biotin-avidin system, determination of circulating immune complexes, and evaluation of antibody response in different hydatid patients. Am J Trop Med Hyg 1988; 36: 93-96.
8. Gadea I, García de Lomas J Serología de la hidatidosis. Enferm Infecc y Microbiol Clin 1991; 4: 237-247.
9. Younes S, Dirk J, Osuna A Serologic recognition of hydatid cyst antigens using different methods. Diagn Microbiol Infect Dis 1996; 24: 205-211.
10. Force L, Josep M, Alfonso C Evaluation of Eight serological tests in the diagnosis of human echinococcosis and follow up. Clin Infect Dis 1992; 15: 473-480.
11. Orduña A, Espinosa M, Bratos M, Rodríguez A Estudio de la evolución serológica posquirúrgica en pacientes con hidatidosis mediante pruebas clásicas y pruebas ELISA. Enferm Infecc Microbiol Clin 1986; 4: 213-220.
12. Navaro-Zorraquino M, Larrad L, Lozano R, Sainz M, Roman J Cellular and humoral immunological response in hydatid patients undergoing surgery. Arch Hidatidosis 1999; 30: 401-410.
13. Ravinder PT, Parija SC, Rao KS Evaluation of human hydatid disease before and after surgery and chemotherapy by demonstration of hydatid antigens and antibodies in serum. J Med Microbiol 1997; 46: 856-864
14. Dottorini S, Tassi C, Baldelli F ELISA (Enzyme-Linked Immuno Assay) for diagnosis of human hydatid disease. Bull Ist Sieroter Milanese 1981; 60: 137-143.
15. Lorca M, Escalante H, García A, Denegri M, Sierra P, Silva M. Estandarización y evaluación de una técnica de ELISA para el diagnóstico de la hidatidosis humana. Parasitol Día (Chile) 1991;15:74-8.
16. Manterola C, Cuadra A, Muñoz S, Sanhueza A, Bustos L, Vial M et al. In a diagnostic test study the validity of three serodiagnostic test was compared in patients with liver echinococcosis. Journal.