

DIAGNOSTICO DE LA HIDATIDOSIS MEDIANTE LA DOBLE DIFUSION EN GEL

Dres. Jorge A. Guisantes y Luis A. Yarzabal¹

Se analizan los resultados obtenidos en el diagnóstico de la hidatidosis humana mediante la prueba de la doble difusión en gel, para lo cual se empleó antígeno hidatídico estandarizado por medio de análisis inmunoelectroforético. La prueba, de ejecución sencilla, ha revelado una buena sensibilidad.

Introducción

En los últimos años se han acumulado datos que sugieren que las técnicas más recomendables para el inmunodiagnóstico de la hidatidosis serían la hemaglutinación indirecta (HAI) y la inmunoelectroforesis (IEF) (1-3).

Sin embargo, estas técnicas, harto sensibles y específicas, son de ejecución algo complicada y requieren personal y equipo especializados, no disponibles en todos los laboratorios. Por lo tanto, es necesario continuar buscando técnicas más sencillas al alcance de un personal con preparación corriente y en un laboratorio con equipo mínimo.

La técnica de la doble difusión en gel se ha incorporado al diagnóstico de numerosas afecciones, por ser uno de los procedimientos más sencillos disponibles en la actualidad para demostrar la formación de sistemas precipitantes antígeno-anticuerpo.

Esta técnica se ha utilizado en el estudio de la hidatidosis para analizar la composición antigénica de los escólices (4) y del líquido hidatídico (4-9), ante sueros hiperinmunes y de humanos afectados por la enfermedad. Abrantes y Avila (10) evaluaron esta técnica en el diagnóstico de casos presumiblemente postoperatorios de hidatidosis humana, empleando como antígenos líquido hidatídico ovino y escólices.

De acuerdo con estas consideraciones se ha juzgado conveniente evaluar una variante de la doble difusión en gel en el diagnóstico preoperatorio de esta zoonosis.

Materiales y métodos

Antígeno

Se utilizó líquido hidatídico, extraído asépticamente de quistes de hígado de bovino, que luego se centrifugó a 10,000 rpm durante 45 minutos dializándose el sobrenadante durante 48 horas contra un volumen 100 veces superior de agua destilada a 4°C. Posteriormente, este líquido fue liofilizado y conservado en esa forma.

El antígeno hidatídico se estandarizó inmunológicamente por análisis inmunoelectroforético, y luego se seleccionaron aquellos lotes que por IEF ante sueros hiperinmunes de conejo, contenían un mínimo de seis fracciones antigénicas parasitarias incluyendo la fracción cinco de Capron *et al.* (1), específica de *E. granulosus*, y no más de cuatro fracciones antigénicas provenientes del hospedero.

Sueros

Se estudiaron en total 124 sueros humanos obtenidos de: a) 62 pacientes de hidatidosis confirmada después por cirugía; b) 20 pacientes con otras parasitosis (4 distomatosis hepática por *Fasciola hepatica*, 3 esquistosomiasis, 3 oxiuriasis, 3 tricocefalosis, 3 amibiasis, 2 ascaridiasis, 1 teniasis y 1 himenolepiasis por *H. nana*); c) 22 pacientes con afecciones no parasitarias (7 cirrosis

¹Laboratorio de Inmunología Parasitaria, Sección de Inmunología, Departamento de Laboratorio Clínico, Hospital de Clínicas, Montevideo, Uruguay.

hepáticas, 6 neoplasmas broncopulmonares, 4 aspergilosis respiratorias, 2 mielomas, 2 leucosis y 1 poliartritis crónica primaria) algunas de las cuales podrían generar resultados positivos falsos con las técnicas de fijación del complemento HAI e inmunofluorescencia (11, 12), y d) 20 donantes sanos.

Los sueros se conservaron por congelación a -20°C y se utilizaron concentrados tres veces mediante liofilización.

Técnica

Se utilizaron láminas de vidrio de 10.5×5 cm, sobre las cuales se distribuyó homogéneamente una solución de agarosa al 0.9% en tampón veronal sódico pH 8.2. El diagramado consistió en tres orificios circulares de 14 mm de diámetro colocados en línea, alternados con dos orificios circulares de 3 mm de diámetro, y separados unos de otros por una distancia de 4 mm (figura 1). Los orificios mayores se llenaron con los sueros y los menores con el antígeno. Este último se usó a una concentración de 200 mg/ml de tampón veronal sódico pH 8.2.

Las láminas así preparadas se colocaron en cubas de vidrio con ambiente húmedo y se

dejaron difundir los reactivos 24 horas a temperatura ambiente y 24 horas a 4°C ; se sumergieron durante una hora en citrato trisódico al 5% para disolver precipitados inespecíficos (1), y se anotó el número de bandas de precipitación presentes en ese momento; luego se lavaron con solución salina fisiológica, durante tres días, para eliminar toda traza de suero o de antígeno libre; y posteriormente, se desmineralizaron y desecaron, coloréandolas con una solución de amido-schwarz al 1/1,000 para su lectura definitiva.

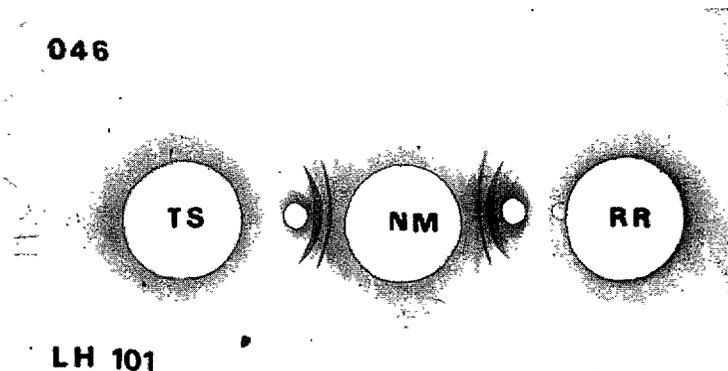
Todos los sueros que dieron origen a bandas de precipitación persistentes después del lavado con citrato trisódico se consideraron positivos.

Resultados y conclusiones

El cuadro 1 expone la sensibilidad comparada de la doble difusión en gel de agarosa (DDG) y de la IEF en 62 casos de hidatidosis confirmada quirúrgicamente.

La prueba demostró una elevada sensibilidad global (88.7%) superando a la de la IEF (82.2%) y reveló anticuerpos precipitantes en seis casos de hidatidosis en los que la IEF había resultado negativa (cuadro 2).

FIGURA 1—Vista de las bandas de precipitación obtenidas enfrentando el antígeno hidatídico ante el suero de un paciente de hidatidosis.^a



^a RR y TS: sueros de afecciones no hidatídicas; NM: hidatidosis confirmada.

CUADRO 1—Resultados de las pruebas de doble difusión en gel (DDG) e inmunoelectroforesis (IEF) en relación con la localización parasitaria en 62 casos de hidatidosis confirmada.

Localización	No.	Casos							
		DDG				IEF			
		Posi- tivos	%	Nega- tivos	%	Posi- tivos	%	Nega- tivos	%
Pulmonar	34	29	85.2	5	14.7	27	79.4	7	20.5
Hepática	12	12	100.0	0	0.0	11	91.6	1	8.3
Otras	16	14	87.5	2	12.5	13	81.2	3	18.7
Total	62	55	88.7	7	11.2	51	82.2	11	17.7

La sensibilidad e intensidad de la respuesta estuvo relacionada con la localización de la hidátide y el estado de la misma. En efecto, confirmando lo observado con otras técnicas en trabajos anteriores (2, 3, 12-16), el porcentaje de positividad fue mayor en la localización hepática (100%) que en la pulmonar (85.2%), y resultó notablemente inferior en el grupo de quistes hialinos en relación con los infectados y rotos (cuadro 3).

En lo que respecta a la especificidad de la DDG, los tres grupos de control utilizados en la experiencia revelaron un porcentaje de positividad global de 20.9% (cuadro 4). En el grupo de sueros de pacientes con afecciones no parasitarias los siete casos positivos correspondieron a: 5 cirrosis hepática, 1 mieloma y 1 aspergilosis pulmonar (cuadro 5).

De los 20 individuos con otras parasitosis solo tres casos (1 teniasis, 1 oxiuriasis y 1 himenolepiasis) revelaron una banda tenue de precipitación. Asimismo, la técnica detectó bandas de precipitación en tres de 20 sueros de individuos sanos en los que no existían elementos que sugirieran hidatidosis.

La IEF no reveló anticuerpos precipitantes específicos contra líquido hidatídico en los sueros de pacientes no hidatídicos y donantes sanos con resultados positivos a la DDG.

El número de bandas de precipitación en el grupo de 62 enfermos con hidatidosis

CUADRO 2—Comparación de los resultados obtenidos con la doble difusión en gel (DDG) e inmunoelectroforesis (IEF) en 62 casos de hidatidosis confirmada quirúrgicamente.

	DDG + IEF +	DDG + IEF -	DDG - IEF -	DDG - IEF +	Total
No. de casos	49	6	5	2	62

CUADRO 3—Resultados de las pruebas de doble difusión en gel (DDG) e inmunoelectroforesis (IEF) en relación con el estado de los quistes hidatídicos.

Estado de los quistes	No.	Casos			
		DDG		IEF	
		Posi- tivos	Nega- tivos	Posi- tivos	Nega- tivos
Hialinos	18	12	6	10	8
Infectados	3	3	0	3	0
Rotos	7	7	0	6	1
Restos parasitarios	9	9	0	8	1
Total	37	31	6	27	10

confirmada varió entre 1 y 11. Es de interés que 35 de ellos revelaron tres o más bandas de precipitación en la DDG (cuadro 6). Por el contrario, el número de sistemas precipitantes revelados en los casos de afecciones no hidatídicas nunca fue superior a dos (cuadro 5). Además, en estos casos las características morfológicas de las bandas difirieron de las reveladas en los casos de hidatidosis, por ser en general más tenues y

CUADRO 4—Especificidad de la doble difusión en gel en el diagnóstico de la hidatidosis. Resultados obtenidos ante sueros de afectados por enfermedades no parasitarias, de portadores de diversas parasitosis (no hidatídicas) y de donantes sanos.

Sueros	Casos		
	No.	Positivos	Negativos
Enfermedades no parasitarias	22	7 (31.8%)	15
Diversas parasitosis	20	3 (15%)	17
Donantes sanos	20	3 (15%)	17
Total	62	13 (20.9%)	49

poco definidas (figura 2). Basándose en estas consideraciones, y reteniendo sólo aquellos casos que dieron origen a más de dos bandas de precipitación, se lograría un aumento relevante de la especificidad. No obstante, la adopción de tal criterio provocaría un descenso en la sensibilidad, que en esta experiencia quedaría reducida al 56.4% (35 casos en un total de 62).

Los hallazgos expuestos y la sencillez de la técnica constituyen argumentos importantes a favor de su empleo en estudios seroepidemiológicos, o para seleccionar casos aislados clínicamente compatibles con hida-

tidosis, que merezcan un estudio inmunológico más completo.

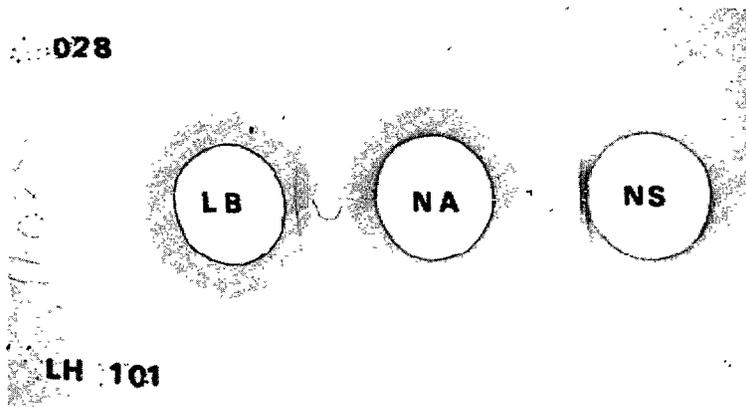
CUADRO 5—Número de sistemas precipitantes revelados por la técnica de doble difusión en gel en casos de otras parasitosis y de afecciones no parasitarias.

Afecciones	Casos		Casos por número de sistemas precipitantes		
	Estudiados	Positivos	1	2	Más de 2
Himenolepiasis	1	1	1	0	0
Teniasis	1	1	1	0	0
Oxiuriasis	3	1	1	0	0
Cirrosis	7	5	3	2	0
Aspergilosis	4	1	1	0	0
Mieloma	2	1	0	1	0
Total	18	10	7	3	0

CUADRO 6—Número de sistemas precipitantes revelados por las técnicas de doble difusión en gel (DDG) e inmunolectroforesis (IEF) en 62 casos de hidatidosis confirmada quirúrgicamente.

Técnica	Casos por número de sistemas precipitantes															
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	16	Total			
DDG	7	8	12	5	8	8	9	2	2	0	1	0	62			
IEF	8	6	8	10	8	6	6	4	2	2	1	1	62			

FIGURA 2—Se observa el aspecto de las bandas de precipitación obtenidas enfrentando el antígeno hidatídico ante sueros de afecciones no hidatídicas.^a



^a LB y NA: aspergilosis pulmonares; NS: mielomatosis.

Resumen

Los autores analizan las posibilidades de aplicación de la técnica de doble difusión en gel de agarosa al diagnóstico de la hidatidosis, para lo cual emplearon como antígeno líquido hidatídico bovino, liofilizado y estandarizado mediante análisis inmunoelectroforético.

Se estudiaron muestras de 62 sueros preoperatorios de enfermos con hidatidosis confirmada quirúrgicamente: 20 de pacientes con otras parasitosis; 22 de portadores de afecciones no parasitarias, y 20 de donantes sanos.

La prueba demostró una sensibilidad elevada (88.7%), superior a la de la inmunoelectroforesis (82.2%), aunque de mayor inespecificidad (20.9%).

El número de bandas de precipitación en

el grupo de enfermos de hidatidosis varió entre 1 y 11. En 35 de los 62 sueros reactivos se observaron tres o más bandas de precipitación. En los grupos de control el número máximo de bandas comprobado fue de dos.

Basados en estos resultados, los autores recomiendan el uso de la doble difusión en gel de agarosa como prueba tamiz para estudios en gran escala (seroepidemiológicos), o para seleccionar aquellos casos aislados destinados a un estudio inmunológico más completo. □

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Víctor M. Varela-Díaz, Centro Panamericano de Zoonosis, Oficina Sanitaria Panamericana, su crítica y colaboración para realizar este trabajo; a la Dra. Frida Náquira (Lima, Perú), y al Dr. Félix Náquira (Arequipa, Perú) la contribución de un grupo de sueros que se usaron en este estudio.

REFERENCIAS

- (1) Capron, A., A. Vernes, y J. Biguet. Le diagnostic immunoelectrophoretique de l'hydatidose. En *Le kyste hydatique du foie. Journées Lyon Hydat.* Lyon: Simep Ed., 1967.
- (2) Capron, A., L. A. Yarzabal, A. Vernes y J. Fruit. Le diagnostic immunologique de l'echinococcosis humaine. (Bilan personnel a propos de 400 observations.) *Path Biol* 18:357-365, 1970.
- (3) Yarzabal, L. A. y A. Capron. Aportes de la inmunoelectroforesis al diagnóstico inmunológico de la hidatidosis. *Tórax* 20:168-174, 1971.
- (4) Kagan, I. G. y L. Norman. Antigenic analysis of *Echinococcus* antigens by agar diffusion techniques. *Am J Trop Med Hyg* 10:727-734, 1961.
- (5) Magath, T. B. The antigen of *Echinococcus*. *Am J Trop Med Hyg* 31(1):1-8, 1959.
- (6) Kagan, I. G. y L. Norman. Analysis of helminth antigens (*E. granulosus* and *S. mansoni*) by agar gel methods. *Ann N Y Acad Sci* 113:130-153, 1963.
- (7) Norman, L., I. G. Kagan, y A. Chordi. Further studies on the analysis of the sheep hydatid fluid by agar gel methods. *Am J Trop Med Hyg* 13:816-821, 1964.
- (8) Chordi, A. e I. G. Kagan. Identification and characterization of antigenic components of sheep hydatid fluid by immunoelectrophoresis. *J Parasit* 51(1):63-71, 1965.
- (9) Sorice, F., L. Castagnari, y F. Milazzo. Caratterizzazione di un antigene globulinico estratto dal liquido cistico e suo impiego nella diagnosi biologica dell'hydatidosi. *Boll Ist Sieroter* (Milan) 45:193-201, 1966.
- (10) Abrantes, P. y R. Avila. Scolex antigens in the laboratory diagnosis of hydatid disease. *Lancet* 2(7565):432-433, 1968.
- (11) Vernes, A. y A. Capron. La inmunofluorescencia indirecta aplicada al diagnóstico de la hidatidosis. *Tórax* 20:198-201, 1971.
- (12) Kagan, I. G. A review of serological tests for the diagnosis of hydatid disease. *Bull WHO* 39:25-37, 1968.
- (13) Kagan, I. G., J. J. Osimani, J. C. Varela, y D. Allain. Evaluation of intradermal and serologic tests for the diagnosis of hydatid disease. *Am J Trop Med Hyg* 15:172-179, 1966.
- (14) Williams, J. F., M. Pérez-Esandi, y R. Oriol. Evaluation of purified lipoprotein antigens of *E. granulosus* in the immunodiagnosis of human infection. *Am J Trop Med Hyg* 20:575-579, 1971.
- (15) Yarzabal, L. A. *La inmunoelectroforesis en la hidatidosis*. Monografía. Montevideo, Facultad de Medicina, 1969.
- (16) López-Lemes, M. H., y L. A. Yarzabal. Hemaglutinación indirecta con antígenos estandarizados mediante análisis inmunoelectroforético en el diagnóstico de la hidatidosis. 5° Congreso Latinoamericano de Microbiología, Punta del Este, Uruguay, diciembre de 1971.

Diagnosis of hydatidosis by double diffusion in gel (Summary)

The authors, considering the possible application of the double diffusion in gel (DDG) technique to the diagnosis of hydatidosis, undertook studies using a bovine hydatid fluid that had been lyophilized and standardized by immunoelectrophoretic analysis as antigen.

Serum samples were taken from 62 preoperative patients with surgically confirmed hydatidosis, 20 patients with other parasitoses, 22 patients suffering from nonparasitic diseases, and 20 healthy donors.

The DDG test showed a higher degree of sensitivity (88.7%) than did immunoelectro-

phoresis (82.2%)—but there was considerable inespecificity (20.9%).

The number of precipitin bands for the group of patients with hydatidosis ranged between 1 and 11. Three or more were observed in 35 of the 62 reactive sera, while the maximum number observed in the control groups was two.

On the basis of these results, the authors recommend the use of double diffusion in gel as a screening test for large-scale (seroepidemiologic) studies or for the selection of those individual cases that are to be the subject of further immunologic studies.

Diagnóstico da hidatidose mediante difusão dupla em gel (Resumo)

Os autores analisam as possibilidades de aplicação da técnica de difusão dupla em gel de agarose ao diagnóstico da hidatidose, para o que empregaram, como antígeno, líquido hidático bovino liofilizado e uniformizado mediante análise imuno-eletroforética.

Estudaram-se amostras de 62 soros pré-operatórios de pacientes de hidatidose cirurgicamente confirmada: 20 amostras de pacientes com outras parasitoses; 22 de portadores de afecções não parasitárias e 20 de doadores sadios.

A prova demonstrou uma alta sensibilidade (88,7%), superior à da imuno-eletroforese

(82,2%), embora de menor especificidade (20,9%).

O número de faixas de precipitação no grupo de doentes variou de 1 a 11. De um total de 62 soros reativos, em 35 observaram-se três ou mais faixas de precipitação. Nos grupos de controle, foi de dois o número máximo de faixas comprovado.

Com base nesses resultados, os autores recomendam o uso da difusão dupla em gel de agarose como prova-filtro para estudos em grande escala (sero-epidemiológicos), ou para a seleção dos casos isolados que se destinam a um estudo imunológico mais completo.

Diagnostic de l'hydatidose par l'épreuve de double diffusion en gélose (Résumé)

Les auteurs examinent les possibilités d'application de la technique de double diffusion en gélose d'agarosa au diagnostic de l'hydatidose. A cette fin, ils ont utilisé comme antigène du liquide hydatidique bovin, lyophilisé et normalisé au moyen de l'immuno-électrophorèse.

Ils ont étudié les échantillons de 62 sérums pré-opératoires de malades atteints d'hydatidose confirmée chirurgiquement: 20 de malades atteints d'autres parasitoses; 22 de porteurs d'affections non parasitaires et 20 de donneurs en bonne santé.

L'épreuve a révélé une sensibilité élevée (88, 7%), supérieure à celle de l'immuno-électrophorèse (82,2%), bien que de spécificité indéterminée (20,9%).

Le nombre de bandes de précipitation dans le groupe des malades atteints d'hydatidose a varié entre 1 et 11. Dans 35 des sérums des 62 sérums réactifs on a constaté trois bandes ou plus de précipitation. Chez les groupes de contrôle, le nombre maximum de bandes relevé a été de deux.

Tenant compte de ces résultats, les auteurs recommandent l'emploi de la double diffusion en gélose d'agarosa en tant qu'analyse granulométrique pour les études à grande échelle (séro-épidémiologiques) ou pour choisir les cas isolés destinés à une étude immunologique plus complète.