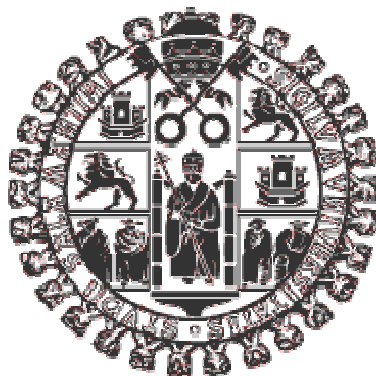


**VNiVERSiDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA,  
ECOLOGÍA EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA**



**TESiS DOCTORAL**

**VALIDACIÓN DE UN NUEVO ANTÍGENO RECOMBINANTE  
PARA EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON  
HIDATIDOSIS, Y SU APLICACIÓN A UN TEST COMERCIAL**

**Ana Hernández González**

**2012**



**VNiVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA,  
ECOLOGÍA EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA**

**VALIDACIÓN DE UN NUEVO ANTÍGENO RECOMBINANTE  
PARA EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON  
HIDATIDOSIS Y SU APLICACIÓN A UN TEST COMERCIAL**

Memoria presentada por ANA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ para optar al  
grado de DOCTORA EN BIOLOGÍA

Salamanca, a \_\_\_ de julio de 2012

Esta tesis ha sido financiada con una Ayuda Predoctoral en el marco del Programa “Junta de Ampliación de Estudios” del CSIC y los proyectos CSI269A11-2 y CSI08A08 de la Junta de Castilla y León.



**LA DRA. MARÍA DEL MAR SILES LUCAS, INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC), EN EL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SALAMANCA,**

**CERTIFICA**

Que la memoria titulada “VALIDACIÓN DE UN NUEVO ANTÍGENO RECOMBINANTE PARA EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON HIDATIDOSIS Y SU APLICACIÓN A UN TEST COMERCIAL”, presentada por Dña. Ana Hernández González para optar al grado de Doctora en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide y firma el presente certificado en Salamanca, a \_\_\_ de julio de 2012.

Fdo. Dra. María del Mar Siles Lucas



**EL DR. FERNANDO SIMÓN MARTÍN, CATEDRÁTICO DE PARASITOLOGÍA EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA, ECOLOGÍA, EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

**CERTIFICA**

Que la memoria titulada “VALIDACIÓN DE UN NUEVO ANTÍGENO RECOMBINANTE PARA EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON HIDATIDOSIS Y SU APLICACIÓN A UN TEST COMERCIAL”, presentada por Dña. Ana Hernández González para optar al grado de Doctora en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. María del Mar Siles Lucas, en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y bajo mi tutela.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide y firma el presente certificado en Salamanca, a \_\_\_ de julio de 2012.

Fdo. Dr. Fernando Simón Martín





*Dedico esta Tesis*  
*a mi madre y a mis abuelos*  
*por todo su cariño*



## AGRADECIMIENTOS

En este apartado quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de forma directa o indirecta me prestaron su apoyo científico, humano y material en el proceso de elaboración de esta Tesis Doctoral.

Especialmente quisiera mostrar mi gratitud a la Dra. Mar Siles Lucas por los años de dedicación a mi formación, por su interés y esfuerzo para sacar adelante este trabajo, por la dirección del mismo, por facilitarme todos los recursos necesarios y en general por la gran ayuda prestada a todos los niveles en el desarrollo de esta Tesis. Gracias también por la confianza depositada en mí desde un principio, y por el apoyo dado durante las estancias en el extranjero. Gracias por todo Mar.

Mi gratitud a todas las personas que nos facilitaron los sueros de pacientes, que nos ayudaron con la estadística, con la aportación de los datos necesarios y en la elaboración de las tiras, porque sin su colaboración no hubiera sido posible la culminación de esta Tesis.: Dr. Santiago Muñoz Criado del Hospital Clínico Universitario de Salamanca, Dr. Antonio Orduña y Dr. Guillermo Ramos del Hospital Universitario de Valladolid, Dr. Carlos Gézor de Certest Biotec, Dr. Héctor Hugo García y Saúl Santibáñez del Instituto Peruano de Parasitología Clínica y Experimental en Lima, Dr. Bruno Gottstein del Instituto de Parasitología de la Universidad de Berna, Dr. Enrico Brunetti y Luca Piccoli del hospital San Matteo en Pavia, Dra Teresa Gárate del Instituto de Salud Carlos III de Madrid, Dr. Thomas Junghanss y Dra Marija Stojkovic del Hospital Universitario de Heidelberg.

A Edu, Verónica, María, Jose, Isa y Rocío, que empezaron siendo compañeros para convertirse en verdaderos amigos. Porque sin vosotros esto no hubiera sido lo mismo. Muchas gracias por los buenos ratos, por esas cañas después del curro bien merecidas, por las risas, canciones y bailes de cumpleaños. Por vuestra paciencia al escuchar mis quejas que no han sido pocas y todas mis historias. Incluso las frías tardes de invierno en el laboratorio no fueron tan duras en vuestra compañía. Gracias por vuestros ánimos en esta última etapa de redacción de la Tesis y gracias por aparecer aquel día en Union Street en Aberdeen pitando en un coche, ¡qué ilusión me hizo! En definitiva quería daros las gracias por vuestra alegría y amistad.

María, muchas gracias también por tu ayuda con el word, excel, etc, ¡qué habría hecho yo sin ti! Y gracias Jose por la ayuda con la dilución de los sueros, menos mal que eres el más rápido del Oeste con la pipeta.

A Ana Oleada, Ricardo Pérez y Raúl Manzano por su cariño, apoyo y su disposición a ayudar en todo lo posible.

Gracias también a Alicia Ramajo y Olga Corona, por su simpatía y amistad, por acogerme tan bien en el laboratorio desde el primer día en que me incorporé.

A todos los que nos reunimos en el café ¡¡¡esa juventud del IRNA!!! Por los buenos ratos pasados y los que nos esperan. Gracias porque habéis llenado el centro de vida y color.

Pero mi mayor agradecimiento se lo debo a mi madre, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado a lo largo de la vida. Gracias por tu apoyo mamá.

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>17</b>
1.1. EL PARÁSITO.....	19
1.1.1. MORFOLOGÍA Y CICLO BIOLÓGICO.....	21
1.2. EPIDEMIOLOGÍA .....	25
1.3. PATOGENIA, PATOLOGÍA Y CLÍNICA.....	29
1.4. TRATAMIENTO .....	32
1.4.1. CIRUGÍA.....	32
1.4.2. DRENAJE PERCUTÁNEO.....	34
1.4.3. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO .....	35
1.4.4. “WATCH AND WAIT” .....	37
1.5. DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA HIDATIDOSIS.....	37
1.5.1. TÉCNICAS DE IMAGEN.....	38
1.5.2. TÉCNICAS INMUNODIAGNÓSTICAS .....	42
1.5.2.1. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS CIRCULANTES.....	43
1.5.2.2. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS .....	46
1.5.2.3. INMUNODIAGNÓSTICO: USO DE KITS COMERCIALES.....	64
1.5.2.4. DETECCIÓN DE CITOCINAS .....	67
1.5.3. TÉCNICAS DE DETECCIÓN HISTOLÓGICA DEL PARÁSITO.....	69
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>71</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>75</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>79</b>
4.1. OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS.....	81
4.1.1. OBTENCIÓN DEL LÍQUIDO HIDATÍDICO .....	81
4.1.2. OBTENCIÓN DE LOS CLONES RECOMBINANTES.....	81
4.1.2.1. OBTENCIÓN DEL CLON RECOMBINANTE B2t.....	81
4.1.2.2. OBTENCIÓN DE CLONES RECOMBINANTES DERIVADOS DE LA SECUENCIA B2t .....	83
4.1.2.3. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	86

4.2. CARACTERIZACIÓN DIAGNÓSTICA DE LOS NUEVOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES EN ELISA.....	88
4.2.1. PRIMERA SELECCIÓN DE ANTÍGENOS EN ELISA .....	88
4.2.2. COMPARACIÓN DE LOS ANTÍGENOS 2B2t, B2t Y LH EN ELISA Y UN KIT COMERCIAL DE HAI. INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	90
4.3. CARACTERIZACIÓN DEL ANTÍGENO 2B2T EN COMPARACIÓN CON B2T Y LH, PARA EL SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON HIDATIDOSIS .....	95
4.4. DESARROLLO DE TIRAS INMUNOCROMATO GRÁFICAS PARA EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA HIDATIDOSIS. ....	99
4.4.1. TIRAS INMUNOCROMATOGRÁFICAS PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS.....	99
4.4.1.1. PRIMERA APROXIMACIÓN: DESARROLLO EN CERTEST SL .....	99
4.4.1.1.1. COMPARACIÓN DE LAS TIRAS INMUNOCROMATOGRÁFICAS DE CERTEST CON EL ELISA Y DOS TESTS COMERCIALES.....	106
4.4.1.2. SEGUNDA APROXIMACIÓN: DESARROLLO EN VIRCELL SL.....	107
4.4.1.2.1. COMPARACIÓN DE LOS DOS TESTS INMUNOCROMATOGRÁFICOS ELABORADOS EN VIRCELL JUNTO CON EL ELISA 2B2t .....	108
4.4.2. TIRAS INMUNOCROMATOGRÁFICAS PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS .....	111
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>113</b>
5.1. ANTÍGENOS .....	115
5.1.1. LÍQUIDO HIDATÍDICO .....	115
5.1.2. PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....	115
5.2. CARACTERIZACIÓN DIAGNÓSTICA DE LOS DISTINTOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES EN ELISA.....	119
5.2.1. PRIMERA SELECCIÓN DE ANTÍGENOS EN ELISA .....	119
5.2.2. COMPARACIÓN DE LOS DISTINTOS ANTÍGENOS EN ELISA CON UNA TÉCNICA COMERCIAL DE HAI. INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS .....	120
5.3. SEGUIMIENTO SEROLÓGICO DE PACIENTES CON HIDATIDOSIS .....	133

5.3.1. SEGUIMIENTO TRAS CIRUGÍA O UNA TÉCNICA DE ASPIRACIÓN ..	133
5.3.2. SEGUIMIENTO TRAS UN TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.....	137
5.3.3. SEGUIMIENTO DE PACIENTES EN <i>WATCH AND WAIT</i> .....	141
<b>5.4. TIRAS DE INMUNODIAGNÓSTICO .....</b>	<b>146</b>
5.4.1. TIRAS INMUNOCROMATOGRÁFICAS PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS .....	146
5.4.1.1. PRIMERA APROXIMACIÓN: DESARROLLO EN CERTEST SL.....	146
5.4.1.1.1. COMPARACIÓN DE LAS TIRAS INMUNOCROMATOGRÁFICAS DE CERTEST CON EL ELISA-2B2t Y DOS TESTS COMERCIALES.....	150
5.4.1.2. SEGUNDA APROXIMACIÓN: DESARROLLO EN VIRCELL SL .....	154
5.4.1.2.1. COMPARACIÓN DE LOS DOS TESTS INMUNOCROMATOGRÁFICOS ELABORADOS EN VIRCELL JUNTO CON EL ELISA 2B2T .....	154
5.4.2. TIRAS PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENO B2.....	166
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>169</b>
6.1. OBTENCIÓN Y PRODUCCIÓN DE LAS NUEVAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....	172
6.2. DIAGNÓSTICO DE LA HIDATIDOSIS .....	173
6.2.1. PRESELECCIÓN DE ANTÍGENOS EN ELISA-IGG .....	173
6.2.2. EFICIENCIA DIAGNÓSTICA DE LOS RECOMBINANTES EN ELISA. .	174
6.2.3. INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	180
6.2.4. APLICACIÓN DEL ANTÍGENO 2B2t EN TIRAS INMUNOCROMATOGRÁFICAS .....	184
6.3. SEGUIMIENTO DE LA HIDATIDOSIS .....	187
6.3.1. SEGUIMIENTO TRAS CIRUGÍA O UNA TÉCNICA DE ASPIRACIÓN ..	188
6.3.2. SEGUIMIENTO TRAS TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO .....	190
6.3.3. SEGUIMIENTO <i>WATCH AND WAIT</i> .....	194
6.4. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS B POR INMUNOCROMATOGRAFÍA	196
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>197</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>201</b>
<b>9. ANEXO I. PUBLICACIONES</b>	

**10. ANEXO II. PATENTE**

**11. ANEXO III. PREMIO**



# **1. INTRODUCCIÓN**

---



## 1.1. EL PARÁSITO

*Echinococcus granulosus* es un cestodo de distribución cosmopolita que se transmite en un ciclo predador-presa, más frecuentemente entre perro y oveja. En su fase larvaria, denominada quiste hidatídico, es causante de la hidatidosis unilocular en diferentes herbívoros y omnívoros, denominados hospedadores intermediarios. Esta parasitosis se clasifica como una antropozoonosis, ya que el quiste hidatídico también afecta al hombre.

*E. granulosus* es una de las cinco especies reconocidas dentro del género *Echinococcus*, y se encuadra dentro de *phylum* Platyhelminthes, con una posición taxonómica que se detalla en la figura 1.

<p>Phylum PLATYHELMINTES.</p> <p>Clase CESTODA (Rudolphi 1804).</p> <p>Subclase EUCESTODA Southwell, 1930.</p> <p>Orden CYCLOPHYLLIDEA Beneden in Braun, 1900.</p> <p>Familia TAENIIDAE Ludwig, 1886.</p> <p>Género <i>Echinococcus</i> Rudolphi, 1801.</p> <p>Especies:</p> <p><i>Echinococcus granulosus</i> (Batsch 1786) Rudolphi, 1801.</p> <p><i>Echinococcus multilocularis</i> Leuckart, 1863.</p> <p><i>Echinococcus oligarthrus</i> Diesing, 1863.</p> <p><i>Echinococcus vogeli</i> Rausch y Bernstein, 1972.</p> <p><i>Echinococcus shiquicus</i> Xiao y cols., 2006.</p>
---

**Figura 1.** Clasificación taxonómica del género *Echinococcus*.

Es importante mencionar que se han definido nueve genotipos dentro de la especie *E. granulosus* (G1 a G8 y G10), correspondientes a nueve cepas diferentes que se caracterizan, entre otros, por su especificidad de hospedador intermediario (Bowles y cols., 1992, 1994; Lavikainen y cols., 2003). El genotipo G9 fue descrito por Scott y cols. (1997) en quistes procedentes de humanos, sin embargo su estatus es controvertido porque no se encontró en estudios posteriores sobre aislados similares, y podría representar el genotipo G7 (Kedra y cols., 1999).

Los estudios llevados a cabo para la designación de genotipos, además, podrían estar sobrestimando el número de cepas válidas, ya que pequeñas diferencias en la sustitución de nucleótidos fueron consideradas suficientes para distinguir diferentes genotipos incluso cuando solo se habían estudiado unos pocos especímenes o uno para cada genotipo. Por ejemplo, esto ocurre en el caso de los genotipos G1/2/3, donde solo se encuentran entre 1 y 3 nucleótidos diferentes en las secuencias COXI y NADH. Además no demuestran especificidad de hospedador intermediario y se dan conjuntamente (Rosenzvit y cols., 1999; Jenkins y cols., 2005; Vural y cols., 2008), de modo que no deberían ser consideradas cepas separadas (Thompson, 2008). Lo mismo ocurre con los genotipos G6 y G7, con solo un nucleótido diferente en la secuencia COXI y en la NADH (Bowles y cols., 1992). Nakao y cols. (2007) sugieren que estos dos genotipos deberían ser considerados como un único grupo genético, reclamando junto con otros autores la categoría de especie para los subgrupos formados por distintos genotipos. En la tabla 1 se muestran los distintos genotipos descritos y las especies sugeridas para *E. granulosus*.

La cepa más frecuentemente asociada a la hidatidosis humana es la ovina (G1), aunque se ha encontrado un número significativo de casos humanos debidos a otras cepas en varias regiones del mundo, como la que se ha descrito en ovinos de Tasmania (G2), la cepa que afecta a camellos (G6), la suína (G7) y la encontrada en cérvidos (G8). También se han descrito algunos casos asociados a la cepa G5 (McManus, 2006).

En España se han definido tres cepas genéticamente diferentes dentro de esta especie, adaptadas a ovejas, vacas, cabras, cerdos, jabalíes y humanos (G1), a equinos (G4) y a cerdos, jabalíes y cabras (G7) (Siles-Lucas y Cuesta-Bandera, 1992; 1996; Siles-Lucas y cols., 1993; 1996; González y cols., 2002; Daniel-Mwambete y cols., 2004).

**Tabla 1.** Genotipos de *Echinococcus granulosus* descritos, especies propuestas, rango de hospedadores y distribución geográfica.

Cepa (genotipo) - Especie propuesta	HD	HI	Infecciones humanas	Localización geográfica
Oveja (G1), Oveja Tasmania (G2), Búfalo (G3) - <i>E. granulosus</i>	Perro, zorro, hiena, dingo, chacal, lobo	Oveja, vaca, yak, cerdo, camello, cabra, marsupiales, jabalí	Muy comunes	África, Australia, China, Europa, Oriente Medio, Rusia, América
Caballo (G4) - <i>E. equinus</i>	Perro	Caballo y otros équidos	Desconocidas	Europa, Oriente Medio, África
Vaca (G5) - <i>E. ortleppi</i>	Perro	Vaca	Poco comunes	Europa, África, India, Nepal, Rusia
Camello (G6), Cerdo (G7), Cérvidos (G8, G10) - <i>E. canadensis</i>	Perro, lobo, coyote	Camello, oveja, cabra, cerdo, cérvidos (vaca?)	Poco comunes	Europa, Rusia, Oriente Medio, China, África, América
Facoceros (G?) - <i>E. felidis</i>	León	Facocero	Desconocidas	África

Adaptado de Torgerson y Budke (2003), Jenkins y cols. (2005) y McManus (2006). HD, hospedador definitivo; HI, hospedador intermediario.

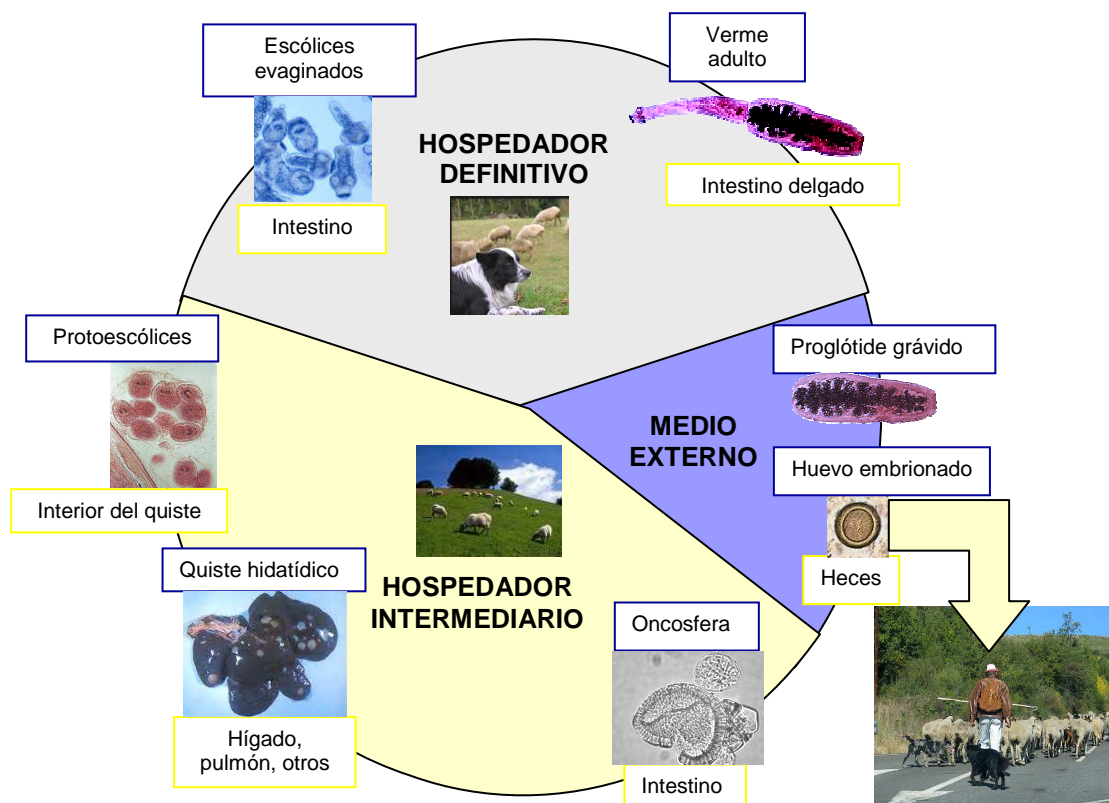
### 1.1.1. MORFOLOGÍA Y CICLO BIOLÓGICO

El ciclo de transmisión de *E. granulosus* es un ciclo indirecto en el que, tal y como se refleja en la figura 2, un carnívoro actúa como hospedador definitivo (HD) y diferentes especies de mamíferos pueden ejercer de hospedadores intermediarios (HI). El hombre se considera un HI accidental.

Los vermes adultos del parásito, de pocos milímetros de longitud y constituidos por un escólex armado con cuatro ventosas, el cuello y varios proglótides –normalmente en un máximo de cuatro-, se alojan en el intestino delgado del HD. Tras la fecundación de los vermes, que generalmente se lleva a cabo por autofecundación (Haag y cols., 1999), éstos producen los huevos en el interior del último proglótide, denominado grávido, que se desprende del resto del verme adulto y sale al exterior con las heces del

cánido contaminando el medio, donde pueden ser ingeridos por los HI. En el medio externo, los huevos pueden mantener su viabilidad durante varios meses entre -30 C y 30 C (Colli y Williams, 1972) hasta ser ingeridos por un HI.

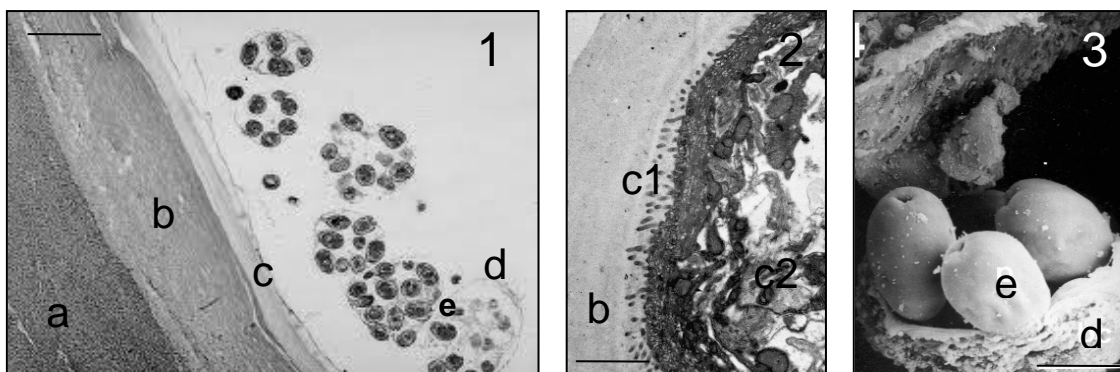
Tras la ingestión, los huevos eclosionan liberando en el intestino delgado del HI un embrión hexacanto de unos 20 µm de diámetro, denominado oncosfera. Estos embriones atraviesan la mucosa intestinal y alcanzan los capilares sanguíneos o linfáticos. A través de la circulación podrán llegar a diferentes tejidos -principalmente al hígado y al pulmón- donde la oncosfera se alojará, comenzando su transformación y desarrollo hasta adquirir sus características definitivas de quiste hidatídico, también denominado metacestodo, que es la fase larvaria del parásito.



**Figura 2.** Ciclo biológico de *E. granulosus* en un ambiente doméstico.

El metacestodo es un quiste unilocular, de forma esférica y relleno de un líquido claro denominado líquido hidatídico. El líquido hidatídico es una mezcla compleja de sales, lipoproteínas y otros compuestos orgánicos que son la principal fuente de antígenos para el inmunodiagnóstico (Rogan y cols., 2006).

El quiste presenta una membrana interna celular, llamada capa germinal, y una capa externa acelular llamada capa laminar de variable grosor (varios milímetros) que es segregada por la capa germinal a través de sus microtriquias (figura 3). Cada quiste se encuentra rodeado de una capa de naturaleza granulomatosa producida por la migración de células inmunocompetentes del hospedador alrededor del quiste, que provocan la fibrosis del tejido alrededor del quiste, dando lugar a esta capa de tejido conectivo llamada capa adventicia (Thompson, 1986). A partir de la capa germinal, y más concretamente a partir de células no diferenciadas de la misma, se desarrollan internamente pequeñas vesículas llamadas cápsulas prolíferas, donde se producen los protoescólices mediante división asexual, denominándose a los quistes que contienen protoescólices quistes fértiles.



**Figura 3.** Estructura del quiste hidatídico. Imágenes obtenidas por microscopía convencional (1), electrónica de transmisión (2) y electrónica de barrido (3). Capa adventicia (a), laminar (b) y germinativa (c); cápsula prolígera (d) y protoescólex (e). De la capa germinativa, se derivan microtriquias (c1 en 2). Hacia el interior, la capa germinativa presenta células no diferenciadas (c2), que darán lugar a las cápsulas prolíferas (d), en cuyo interior se producen los protoescólices (e). Barras: 10  $\mu\text{m}$  (1), 4  $\mu\text{m}$  (2), 0,5  $\mu\text{m}$  (3). Parcialmente adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov> y de Hemphill y cols. (2010).

El ciclo parasitario se cierra cuando el HD se alimenta de las vísceras de animales con quistes, de modo que cada protoescólex se evaginará al llegar al duodeno del HD en respuesta a los cambios de pH y exposición a la bilis (Smyth y Howkins, 1966). Tras su activación, los escólex se enganchan a la mucosa intestinal penetrando profundamente entre las microvellosidades. Comenzará entonces el crecimiento del verme a partir de la zona del cuello, formándose los proglótidos y

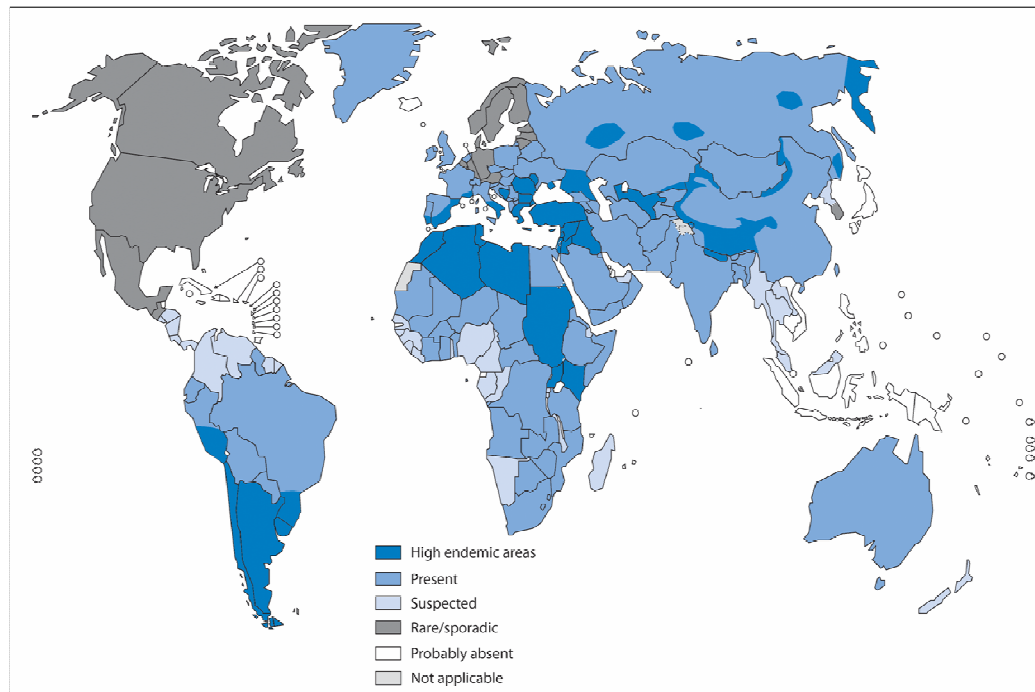
madurando hasta dar lugar a los proglótides grávidos, que contienen entre 600-800 huevos cada uno.

El parásito puede perpetuarse en ciclos domésticos o en ciclos silvestres. Los ciclos domésticos están asociados a explotaciones ganaderas donde los ovinos son mayoritarios y donde normalmente el perro va a actuar como hospedador definitivo (figura 2). En los ciclos silvestres pueden estar involucrados carnívoros y ungulados que actuarán como reservorios del parásito. A este respecto, se ha descrito la presencia de vermes adultos de *E. granulosus* en el lobo ibérico (Sobrino y cols., 2006) y de quistes hidatídicos en jabalíes de la península ibérica (Martín-Hernando y cols., 2008), que resultan pertenecer al genotipo G1, por lo que los ciclos silvestres son potencialmente infectantes para el hombre.



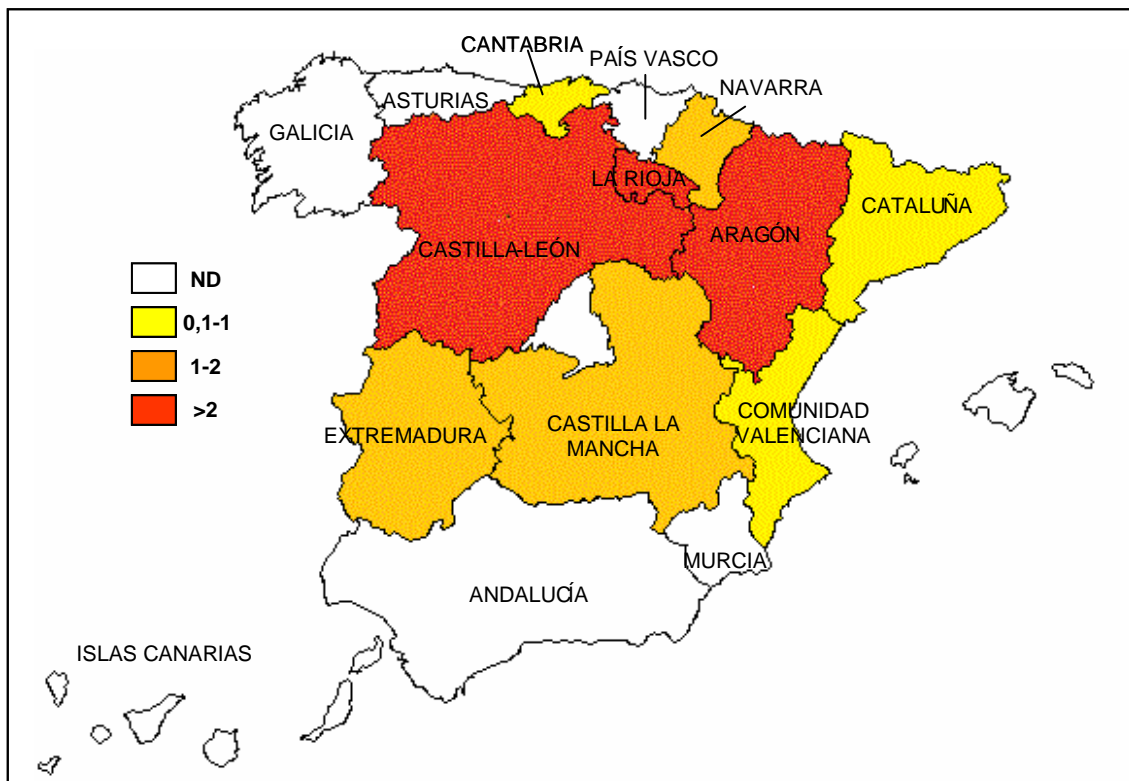
## 1.2. EPIDEMIOLOGÍA

La hidatidosis tiene una distribución cosmopolita (figura 4), con regiones endémicas en muchos países de la cuenca del Mediterráneo, en el norte y este de África, oeste y centro de Asia, China, América del Sur y Australia (McManus y cols., 2003; Jenkins y cols., 2005; Romig y cols., 2006).



**Figura 4.** Distribución mundial de la hidatidosis causada por *Echinococcus granulosus*. [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_echinococcosis\\_2009.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_echinococcosis_2009.png)

En España, la hidatidosis es considerada endémica aunque la infección no tiene una distribución geográfica homogénea (figura 5). Históricamente, las regiones más afectadas han sido Aragón, Castilla La Mancha, Castilla y León, Extremadura, Navarra y La Rioja, siendo todas ellas importantes áreas de pastoreo extensivo de ovinos (Carmena y cols., 2008).



**Figura 5.** Incidencia media de hidatidosis humana en España por Comunidades Autónomas, para el período 2000-2005. La incidencia viene expresada como número de casos por 100.000 habitantes. ND- no declarada. Fuente: Centro Nacional de Epidemiología (<http://193.146.50.130/>; adaptado de Carmena y cols., 2008).

La hidatidosis ha sido una enfermedad de declaración obligatoria desde el año 1982 al 1996 en nuestro país. Los datos oficiales mostraban una incidencia de 2,52 casos por 100.000 habitantes en 1985. Tras la aplicación de programas de control específicos, que se llevan a cabo en su fase de ataque entre 1986 y 1990 en distintas regiones del país, y que se basaron principalmente en el tratamiento periódico de los

perros con praziquantel, la incidencia se estimó en 1,01 casos/100.000 habitantes en el año 1996 (Gutiérrez y cols. 2003).

Desde que la hidatidosis dejó de ser una enfermedad de declaración obligatoria, es difícil realizar un cálculo acerca del número de casos, ya que no todos son notificados y las diferentes fuentes arrojan resultados distintos (Rojo-Vázquez y cols., 2011; tabla 2). Así, se considera que en los últimos años el número de casos ha sido claramente subestimado (Pardo y cols., 2005).

**Tabla 2.** Casos por 100.000 habitantes de hidatidosis en España declarados por distintos medios desde el año 2000 hasta el 2008.

FUENTE	AÑO								
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
EDOs	0,45	0,45	0,48	0,43	0,39	0,37	0,54	0,40	0,40
EFSA	ND	ND	ND	ND	<0,01	0,20	0,20	0,30	0,20
SIM	0,10	0,02	0,08	0,06	0,02	<0,01	0,00	0,06	0,03
CMBS	2,04	1,75	1,75	1,74	1,80	1,39	ND	ND	ND
CyL	1,62	1,70	2,84	2,11	2,00	1,88	2,97	1,90	ND

Fuentes: Ministerio de Sanidad de España para “Enfermedades de Declaración Obligatoria” (EDOs, <http://www.msc.es/estadEstudios/estadisticas/estadisticas/estMinisterio/declarObligatoria.htm>), European Food Safety Authority (EFSA, [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu)), “Sistema de Información Microbiológica” (SIM, <http://www.msc.es/estadEstudios/estadisticas/estadisticas/estMinisterio/microbiologica.htm>), “Conjunto Mínimo Básico de Datos” (CMBS, <http://www.msc.es/estadEstudios/estadisticas/cmbd.htm>), y Consejería de Sanidad y Bienestar Social de la Junta de Castilla y León (CyL, <http://www.saludcastillayleon.es/profesionales/es/informacion-epidemiologica>). ND, no disponible.

La situación de la hidatidosis cambió en aquellos países en los que se implementaron programas de control, y donde posteriormente se aplicaron medidas que indirectamente dificultan el ciclo parasitario, relacionadas con la mayor vigilancia para la recogida e incineración de animales muertos, motivada por otras patologías como el llamado mal de las vacas locas y la lengua azul (Rojo-Vázquez y cols., 2011). Sin embargo, la discontinuación de los programas de control parece resultar en un repunte de la enfermedad hidatídica en ciertas zonas, incluyendo España.

En consonancia con estas observaciones, varias publicaciones recogen datos que apuntan a una posible re-emergencia de la hidatidosis en diferentes regiones de Europa donde los programas de control han cesado, como por ejemplo Gales (Buishi y cols., 2005), España (Pardo y cols., 2005), Grecia (Sotiraki y Chaligiannis., 2010), Rumanía (Calma y cols., 2011) y otros (Dakkak, 2010). En España, el número de casos humanos declarados oficialmente en el año 2006 era de 0,54 casos/100.000 habitantes, siendo el mayor índice en los últimos 7 años. En este año, se registraron casos pediátricos, lo que indica una transmisión activa del parásito (Rojo-Vázquez y cols., 2011).

Otra evidencia de una re-emergencia es el incremento en la tasa de incidencia de *E. granulosus* en el hospedador definitivo. Aunque los trabajos publicados acerca de la prevalencia en perros antes y después de un programa de control son pocos y normalmente se refieren a una región concreta, sus resultados sugieren que tanto en España como en otros países de Europa los perros de áreas rurales y semi-rurales siguen siendo un factor de riesgo importante (Buishi y cols., 2005; Benito y cols., 2006; Rojo-Vázquez y cols., 2011). Además del perro, otros hospedadores definitivos no domésticos, como el lobo ibérico, podrían tener un papel en la transmisión y mantenimiento del ciclo, ya que en los últimos años ha aumentado su población por las políticas de protección. Además, son capaces de desarrollar la equinocosis de genotipo G1, eminentemente zoonótico, lo cual representa un riesgo potencial de infección humana. En otros países europeos como Bielorrusia, Bulgaria, Italia y Finlandia, también se han encontrado lobos parasitados con *E. granulosus* mostrando resultados de prevalencia similares a los encontrados en España (Rojo-Vázquez y cols., 2011).

En cuanto a la prevalencia de la hidatidosis en animales, en nuestro país los datos oficiales de prevalencia en animales domésticos entre los años 2000-2008 recogidos en los correspondientes informes anuales del “European Food Safety Authority” muestran una ligera disminución, excepto en el caso de ovinos y caprinos donde la tasa sube desde un 0,98% a un 3,68%. También se observa un incremento en animales silvestres como jabalíes y cérvidos (Rojo-Vázquez y cols., 2011), lo cual también sugiere cierta re-emergencia de la enfermedad.

En la actual situación (últimos 10 años), los gastos generados por la hidatidosis son cuantiosos, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo, calculándose a nivel global pérdidas en sanidad humana y animal de cerca de tres billones de dólares al año (Budke y cols., 2006).

En España, las pérdidas económicas atribuidas a la infección por *E. granulosus* en humanos y animales en el año 2005 fueron estimadas en 148.964.534 euros. De esta cantidad, 133.416.601 euros se corresponderían a los gastos en diagnóstico, tratamientos quirúrgicos y farmacológicos, cuidados médicos y hospitalización que conllevan los casos humanos. Las pérdidas generadas por los animales infectados se estiman en 15.532.242 euros como consecuencia de la falta de ingresos por la retirada de las vísceras infectadas y una reducción de la productividad debida a la disminución en el crecimiento del animal, disminución en la producción de leche y en la fecundidad (Benner y cols., 2010).

Esta trascendencia económica, junto con sus repercusiones sociales, han propiciado que la hidatidosis sea reconocida recientemente como una enfermedad “olvidada” por la Organización Mundial de la Salud, que la ha integrado dentro de las siete enfermedades zoonóticas más importantes del mundo en relación a las pérdidas en el ámbito humano y animal ([http://www.who.int/zoonoses/neglected\\_zoonotic\\_diseases/en/index.html](http://www.who.int/zoonoses/neglected_zoonotic_diseases/en/index.html)), y también por la Unión Europea, que ha priorizado recientemente la investigación en este campo ([http://www.discontools.eu/home/disease\\_home](http://www.discontools.eu/home/disease_home)).

### **1.3. PATOGENIA, PATOLOGÍA Y CLÍNICA**

Si nos referimos a la equinocosis, en el hospedador definitivo la presencia de los vermes adultos, a pesar de que penetran profundamente entre las vellosidades del intestino delgado, no va a tener efectos patogénicos ni siquiera en animales con alta carga parasitaria, por lo que las infecciones son generalmente asintomáticas (Eckert y Deplazes, 2004).

La hidatidosis, sin embargo, sí suele resultar en una enfermedad crónica con distintos signos y síntomas. Alrededor del 60-80% de las hidatidosis primarias en humanos consisten en un quiste único, y entre el 20-40% de los individuos tienen

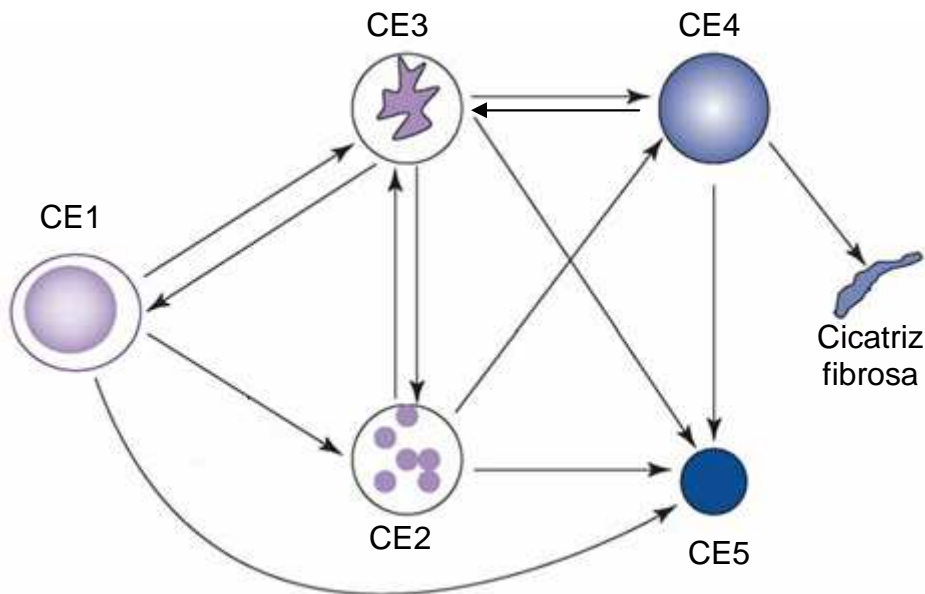
múltiples quistes, a veces con más de un órgano involucrado (Moro y Schantz, 2009). Se ha descrito que ningún parásito produce lesiones en tan diversas localizaciones anatómicas como el metacestodo de *E. granulosus* (Schantz, 1972), pero el hígado es el órgano más comúnmente afectado (alrededor del 65% de los casos), seguido por los casos pulmonares (25% de los casos), siendo menos frecuente la afectación de bazo, riñones, corazón, huesos y sistema nervioso central. La ultrasonografía ha mostrado que los quistes pueden crecer entre 1 y 50 mm por año, dependiendo del órgano en el que se alojen. También pueden no mostrar cambios, disminuir de tamaño o romperse espontáneamente y colapsar (Brunetti y cols., 2010).

Durante su evolución natural, los quistes pueden pasar por diferentes etapas de desarrollo y viabilidad, clasificándose con respecto a lo dictado por el “Informal Working Group on Echinococcosis” de la OMS (Informal Working Group, 2003), basada en la clasificación anterior de Gharbi (1981). Según la apariencia de la lesión en una ultrasonografía, se clasifican en quistes activos (CL, CE1 y CE2), transicionales (CE3a y CE3b) e inactivos (CE4 y CE5). Esta clasificación y su significado se detallan más adelante, en el apartado correspondiente de la sección “Diagnóstico y seguimiento de la hidatidosis” (ver tabla 3).

El efecto de variables internas o externas como la naturaleza e intensidad de la respuesta inmune, infecciones bacterianas y la comunicación del quiste con otras estructuras como el árbol biliar, pueden influir en esta evolución (Rogan y cols., 2006). Esta evolución será espontánea en un porcentaje de pacientes, pero también puede ser forzada por tratamiento. En algunos casos, estadios quísticos “avanzados” pueden retroceder a estadios anteriores, dependiendo de la viabilidad de los tejidos parasitarios dentro del quiste, de modo que si existen porciones viables de la lámina germinal o protoescólicas, el quiste será capaz de regenerarse, mientras que los quistes inactivos no podrán sufrir una regresión (figura 6). Con respecto a esto, existe cierta polémica acerca de la clasificación de quistes tipo CE4 como inactivos, puesto que se ha observado en ocasiones su regresión a quistes transicionales (p. ej., Stojkovic y cols., 2009; Zhang y cols., 2011).

Debido a todas estas variables (localización, número y estado de los quistes; respuesta inmune, complicaciones, etc), la clínica de la hidatidosis es muy compleja y

por tanto el manejo de los pacientes con esta enfermedad también lo es (Eckert y Deplazes, 2004; Junghanss y cols., 2008; Brunetti y Junghanss, 2009).



**Figura 6.** Posible progresión de un quiste hidatídico en el tiempo. Adaptado de Rogan y cols. (2006).

La patogenia de la enfermedad se debe generalmente a los factores mecánicos y a la respuesta inflamatoria local que conlleva el crecimiento del quiste, de modo que la fase inicial de la infección primaria casi siempre es asintomática. Los quistes pequeños, bien encapsulados o calcificados no suelen inducir manifestaciones clínicas y los pacientes podrían mantenerse asintomáticos durante años o de forma permanente. Los síntomas suelen presentarse cuando los quistes alcanzan un cierto tamaño, como resultado de la presión ejercida sobre los tejidos adyacentes. Los síntomas también pueden estar relacionados con la liberación de componentes parasitarios, que si es brusca puede dar lugar a reacciones de hipersensibilidad y en ocasiones la muerte por choque anafiláctico. Si el quiste es fértil, es decir contiene protoescólices, la liberación de su contenido también puede conducir a la aparición, a largo plazo, de hidatidosis secundaria, producto de la diseminación y transformación en quistes de los protoescólices que contuviese el quiste primigenio. En algunas

ocasiones la calcificación de los quistes también puede alterar la funcionalidad del órgano de implantación.

En cuanto a la patología y sintomatología, ésta depende de la localización quística. La hidatidosis hepática puede causar dolor vago en el hipocondrio derecho, atonía de la vesícula biliar, dispepsia, hepatomegalia, hipertensión portal, ascitis, cirrosis biliar, y otros síntomas asociados a esta localización. Si se produce la ruptura del quiste con vertido al árbol biliar puede dar lugar a colangitis y colestasis (Eckert y Deplazes, 2004). En la hidatidosis pulmonar pueden presentarse síntomas como tos crónica, expectoración, pleuritis, disnea, hemoptisis, abscesos pulmonares, atelectasia, derrame pleural, vómica y neumotórax, entre otras manifestaciones (Morar y Feldman, 2003). Los quistes localizados en el sistema nervioso central normalmente son diagnosticados en fases más tempranas que los que se encuentran en otras localizaciones, debido a los desórdenes neurológicos tempranos que inducen. En localizaciones atípicas como los huesos, se forman masas vesiculares que horadan el tejido, produciendo osteolisis. En cualquier caso, los síntomas y signos suelen ser no patognomónicos.

## 1.4. TRATAMIENTO

Actualmente son principalmente cuatro las modalidades de tratamiento que se aplican según cada caso: cirugía, drenaje percutáneo, tratamiento farmacológico con benzimidazoles, y *watch and wait* (mirar y esperar) (WHO Informal Working Group, 1996; Junghanss y cols., 2008; Stojkovic y cols., 2009; Brunetti y cols., 2010). Cada tipo de tratamiento se decide fundamentalmente dependiendo del tipo de quiste según la clasificación ultrasonográfica de la OMS (Informal Working Group, 2003), y también dependiendo de la presencia y tipo de complicaciones.

### 1.4.1. CIRUGÍA

La cirugía es el tratamiento elegido para quistes complicados tales como quistes con posibilidad de ruptura, con infección bacteriana, comunicados con el árbol biliar o que estén ejerciendo presión en órganos vitales adyacentes (Junghanss



y cols., 2008). La cirugía no se recomienda para el tratamiento de quistes asintomáticos inactivos, quistes de difícil acceso o quistes muy pequeños (Brunetti y cols., 2010).

Los procedimientos quirúrgicos más utilizados pueden ser divididos en radicales, conservativos y paliativos. En la cirugía radical se extrae el quiste al completo, incluyendo el periquiste (periquistectomía). En los procedimientos conservativos solo se extrae el material parasitario, realizando una quistectomía abierta con o sin omentoplastia, dejando finalmente un residuo quístico o parte del periquiste. Los tratamientos paliativos consisten en el drenaje de quistes infectados o quistes que comunican con el árbol biliar. Aunque las intervenciones radicales presentan mayor riesgo intraoperatorio también conllevan un menor número de relapsos (hidatidosis secundaria) y de complicaciones postoperatorias que los procedimientos conservativos (Brunetti y Junghanss, 2009). Sin embargo, pueden surgir complicaciones, incluso tras procedimientos quirúrgicos radicales, con morbilidad, mortalidad y relapsos que pueden llegar al 32%, 8% y 20%, respectivamente, en el caso de quistes hepáticos (Junghanss y cols., 2008).

Sobre la profilaxis para minimizar el riesgo de hidatidosis secundaria por vertido de protoescolices, actualmente se recomienda el uso de una solución hipertónica salina al 20% en contacto con la capa germinal por al menos 15 minutos (Brunetti y cols., 2010). Se aconseja también un tratamiento preoperatorio con albendazol o mebendazol empezando al menos una semana antes de la cirugía, y continuado tres meses tras la intervención (Junghanss y cols., 2008). El tratamiento tras la intervención podrá ser mantenido durante más o menos tiempo según las características que presentara el quiste (Crețu y cols., 2012). Sin embargo, estas recomendaciones no se basan en evidencias contrastadas, y reciben una fuerza y grado de validez BIII según la clasificación propuesta por los Servicios Nacionales de Salud del Reino Unido (Junghanss y cols., 2008; <http://www.cebm.net/index.aspx?o=1025>).

### 1.4.2. DRENAJE PERCUTÁNEO

El drenaje percutáneo se realiza mediante técnicas mínimamente invasivas que presentan un riesgo menor que la cirugía. Además el coste de la punción junto con la quimioterapia suele ser más bajo que el tratamiento quirúrgico clásico puesto que son necesarios menos días de hospitalización. Las técnicas de drenaje percutáneo pueden dividirse en dos tipos. Las primeras serían aquellas dirigidas a la destrucción de la lámina germinal (punción quística, aspiración de parte de su contenido, inyección de un agente escolicida y reaspiración del contenido; PAIR), y las segundas estarían dirigidas a la evacuación del endoquiste entero, también conocidas como técnicas de cateterización modificadas. (Brunetti y cols., 2010). En ambos casos, quedará un espacio antes ocupado por el material quístico, que se denomina cavidad residual.

Los agentes escolicidas más utilizados para la inyección intraquística en los tratamientos percutáneos son las soluciones salinas hipertónicas (15-20%) y el alcohol. Sin embargo, se están investigando otros componentes con el fin de encontrar un agente escolicida que no dañe el epitelio biliar (Brunetti y Junghanss, 2009). La inyección directa de mebendazol se ha llevado a cabo con éxito en animales y humanos. Sulfóxidos derivados del albendazol se han probado en animales con resultados positivos pero aún no han sido probados en humanos (rev. in Brunetti y Junghanss, 2009).

El PAIR está indicado para pacientes inoperables, aquellos que rechazan la cirugía, en casos de relapso tras cirugía o fallo a la respuesta a benzimidazoles. Los mejores resultados con PAIR junto con tratamiento con benzimidazoles se han dado en quistes CE1 y CE3a de diámetro mayor a 5 cm (Brunetti y cols., 2010). El PAIR se ha realizado en el tratamiento de quistes hepáticos o situados en la cavidad abdominal, bazo, riñón y huesos, pero está contraindicado para quistes pulmonares. Tampoco se recomienda para quistes hepáticos localizados superficialmente, por un riesgo mayor de vertido de su contenido en la cavidad abdominal, ni en quistes con múltiples vesículas internas, como algunos CE2 y CE3b, ya que según varios estudios con seguimiento, estos tipos quísticos tienden a sufrir regeneración quística tras el PAIR (Brunetti y Junghanss, 2009). El PAIR tampoco es la técnica recomendada para

casos de quistes inactivos o calcificados (CE4 y CE5), quistes con lesiones ecogénicas que denoten algún contenido semisólido o estromatoso, ni quistes con fístula biliar (WHO Informal Working Group, 1996; Brunetti y cols., 2010).

Los riesgos asociados al PAIR son los mismos presentes en cualquier tratamiento percutáneo hepático como aparición de una fístula biliar tras la descompresión intraquística, colangitis esclerosante debido a la llegada del agente escolicida a los vasos biliares, regeneración quística por persistencia de vesículas hijas, reacciones anafilácticas e hidatidosis secundaria (Junghanss y cols., 2008).

Otros tratamientos percutáneos alternativos al PAIR se suelen aplicar para casos de quistes difíciles de drenar por su contenido sólido (CE2 y CE3b). Estas técnicas están dirigidas a la extracción completa del endoquiste y quistes hijos de la cavidad quística utilizando catéteres de mayor calibre que en el caso del PAIR (Brunetti y cols., 2010). Existen varias alternativas en uso como el PEVAC (*Percutaneous EVACuation*), MoCaT (*Modified Catheterization Technique*) y DMFT (*Dilatable Multi-Function Trocar*) (Junghanss y cols., 2008). El uso de estas técnicas de cateterización es más reciente que el PAIR, y por eso aún no se dispone de información suficiente para sacar conclusiones acerca de su eficacia.

### 1.4.3. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

Dos benzimidazoles, albendazol y mebendazol, son los únicos componentes que han sido utilizados en el tratamiento farmacológico de la hidatidosis en humanos. Los benzimidazoles actúan a nivel del citoesqueleto parasitario, uniéndose a la beta tubulina impidiendo su polimerización para la formación de los microtúbulos e induciendo la despolimerización de los ya formados (Hemphill y cols., 2010). Aparentemente estos fármacos primero actuarían sobre las capas externas del quiste, llevando a una marcada reacción inflamatoria que alteraría la homeostasis parasitaria, provocando la pérdida gradual de vitalidad de los protoescolices y la capa germinal, de modo que su actividad es potenciada por la respuesta inmune del individuo infectado (Teggi y cols., 1993). Estos compuestos son potencialmente capaces de matar el metacestodo y por tanto de curar a los pacientes con quistes activos (Vuitton, 2009). Actualmente el albendazol es el fármaco de elección por su

mejor absorción a nivel del intestino necesitándose, por tanto, una dosis diaria menor (Brunetti y Junghanss, 2009).

El praziquantel es otro fármaco frecuentemente mencionado en la literatura. Se ha visto que presenta una elevada eficacia frente a protoescolices y frente a metacestodos en animales de experimentación (Siles-Lucas y Hemphill, 2002; Hemphill y cols., 2010). Revisiones recientes indican que hoy día hay evidencias que apoyan su uso combinado con albendazol como terapia pre- y post-cirugía para la profilaxis de hidatidosis secundaria, con mayor eficacia que el uso de albendazol solamente (Brunetti y Junghanss, 2009).

Un factor importante en el éxito del tratamiento es su duración, ya que cuanto más prolongado sea, menor será la probabilidad de reactivación de los quistes (Hemphill y cols., 2010) y mayor la probabilidad de mejora en cuanto a evidencias de imagen o clínicas (Junghanss y cols., 2008). El tratamiento típicamente suministrado consiste en ciclos de 1 a 6 meses con una discontinuación de 10 a 14 días entre ciclos (Smego y Sebanego, 2005).

La dosis recomendada para el albendazol es de 10-15 mg/kg/día divididos en dos dosis a ingerir con alimentos grasos. Estas cantidades podrán ser modificadas de acuerdo a las características del quiste y a su localización (Crețu y cols., 2012). El mebendazol es absorbido peor y por eso su toma es mayor, de 40 a 50 mg/kg/día en tres dosis con comidas grasas. El praziquantel se puede administrar en dosis de 40 mg/kg/semana combinado con albendazol. (Brunetti y cols., 2010).

Las indicaciones para el tratamiento con benzimidazoles han ido cambiando a lo largo de los años. En general la quimioterapia está indicada para los casos de quistes no operables y pacientes con múltiples órganos afectados o quistes peritoneales (Junghanss y cols., 2008). Además, trabajos recientes han mostrado que hay una fuerte asociación de la eficacia del tratamiento con el tamaño y estadio quístico, respondiendo mejor a la terapia aquellos quistes de diámetro menor a 6 cm y en estadio CE1, ya que presentan unas paredes más finas que quistes en otros estadios más avanzados, mientras que los quistes CE2 y CE3 con vesículas hijas en su interior y paredes más gruesas responden pobremente al tratamiento, y tienen un alto índice de “regeneración” (Stojkovic y cols., 2009; Li y cols., 2011). También se ha encontrado relación entre la efectividad y la edad del paciente (el tratamiento

funciona mejor en pacientes jóvenes), así como con el órgano afectado (p. ej., quistes localizados en los huesos son menos susceptibles a la quimioterapia) (Hemphill y Müller, 2009). La quimioterapia está contraindicada para quistes grandes y con riesgo de ruptura (porque estén situados superficialmente o bien porque están infectados) y no es necesaria para quistes inactivos. Tampoco deberían ser tratados los pacientes con enfermedades que afecten el metabolismo de fármacos (Junghanss y cols., 2008).

#### 1.4.4. “WATCH AND WAIT”

La experiencia adquirida en años recientes con respecto al tratamiento “observar y esperar”, que sigue la evolución quística por técnicas de imagen en pacientes a los que no se les aplica tratamiento alguno, hace que en varios centros una sustancial proporción de los pacientes con hidatidosis sean tratados de este modo (Brunetti y Junghanss, 2009). Esta aproximación clínica se basa en dos hallazgos principalmente (Junghanss y cols. 2008): (i) una gran proporción de los quistes siguen una evolución natural y espontánea hacia la calcificación, y (ii) los quistes que ya han llegado a este estadio van a ser estables y se mantendrán así. El período de tiempo adecuado para tal monitorización se calcula en 10 años, y se aplica a pacientes sin complicaciones y generalmente sin síntomas (Junghanss y cols., 2008).

### 1.5. DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA HIDATIDOSIS

El diagnóstico de la hidatidosis humana se suele abordar utilizando una técnica de imagen. Si ésta da lugar a un resultado que sugiere la presencia del parásito, generalmente se recurre a una segunda prueba diagnóstica para su confirmación. En el ámbito de la investigación, se han desarrollado numerosas pruebas inmunológicas para la detección de antígenos, anticuerpos y citocinas, y también técnicas basadas en la histología y la reacción en cadena de la polimerasa para evidenciar la presencia de material parasitario en muestras clínicas, pero las más específicas y sensibles a nivel de desarrollo no han llegado a ser implementadas como pruebas rutinarias en clínica, por lo que todavía encontramos problemas asociados al diagnóstico de la hidatidosis.

Un segundo problema es el abordaje del seguimiento de pacientes con hidatidosis. Como ya hemos comentado, existen cuatro alternativas principales de manejo clínico: cirugía, drenaje percutáneo, quimioterapia con benzimidazoles y *watch and wait*. Teniendo en cuenta que el riesgo de recurrencia es relativamente alto en el caso de la cirugía, y que las técnicas de drenaje o el tratamiento farmacológico también tiene un porcentaje de fallo y de regresión, la diferenciación entre pacientes con buena progresión (hacia quistes inactivos) y pacientes curados de aquellos pacientes con recurrencias, potenciales estados regresivos y no curados, es un aspecto clave para la evaluación del éxito o fracaso del manejo clínico de la hidatidosis (Carmena y cols., 2007; Frider y Larrieu. 2010). Para el seguimiento de pacientes, la aproximación y los problemas son similares a los encontrados con el diagnóstico, puesto que se desarrollan y aplican las mismas técnicas o similares a las utilizadas en el mismo.

### 1.5.1. TÉCNICAS DE IMAGEN

Las técnicas de imagen aplicadas al diagnóstico de quiste hidatídico en humanos son principalmente la radiografía, ultrasonografía, tomografía axial computerizada y resonancia magnética. La radiografía convencional es útil para localizaciones torácicas y óseas. La tomografía computerizada y la resonancia magnética están indicadas en localizaciones subdiafragmáticas, hidatidosis diseminada, localizaciones extra-abdominales, en quistes complicados y en la evaluación pre-quirúrgica (Brunetti y cols., 2010).

La ultrasonografía es la técnica más utilizada de todas ellas debido a su gran utilidad a la hora de definir número, localización, tamaño y viabilidad de los quistes hidatídicos en el hígado y cavidad abdominal, que son los más frecuentes (Moro y Schantz, 2009). Otras ventajas son que es bien tolerada por la población, es capaz de detectar quistes en etapas relativamente tempranas, hace posible la identificación del tipo de quiste y su realización conlleva un bajo coste (Eckert y Deplazes, 2004). Además es una técnica disponible en cualquier centro sanitario de países desarrollados, y tras la introducción de máquinas portátiles se ha facilitado mucho su utilización en trabajos de campo para determinadas áreas endémicas, en

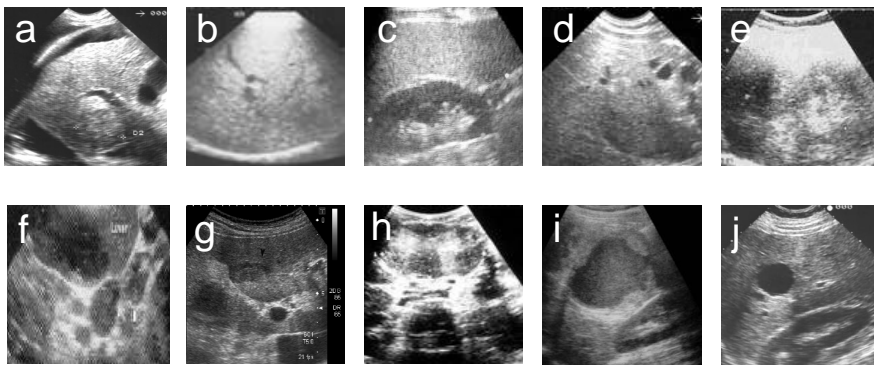
comunidades rurales y zonas de difícil acceso donde otro tipo de técnicas de imagen no se podrían aplicar (Informal Working Group, 2003). De este modo, esta técnica ha sido ampliamente utilizada en el cribado de poblaciones (p. ej., Cohen y cols., 1998; Moro y cols., 2005; Kilimcioglu y cols., 2006; Gavidia y cols., 2008; Del Carpio y cols., 2012), demostrándose su utilidad en estudios epidemiológicos (Rogan y cols., 2006).

La ultrasonografía también es utilizada en el seguimiento de pacientes, independientemente del manejo clínico que se lleve a cabo, ya que nos permite detectar hidatidosis secundarias cuando los quistes alcanzan un tamaño determinado y definir la evolución quística (Frider y Larrieu, 2010; Gocan y cols., 2010; Del Carpio y cols., 2012).

El WHO Informal Working Group on Echinococcosis (IWGE), tal y como ya se ha mencionado, propuso en 2003 una clasificación estandarizada de las distintas imágenes obtenidas por ultrasonografía para quistes hepáticos, que derivaba de una clasificación anteriormente propuesta por Gharbi (1981). El objetivo de estas claves fue facilitar la interpretación de las imágenes, establecer cierta uniformidad de criterios y el entendimiento de la evolución del quiste hidatídico a través de los cambios observados (Junghanss y cols., 2008). La clasificación agrupa los quistes en tres grupos relevantes (Brunetti y Junghanss, 2009): (i) CE1 y CE2 que normalmente son quistes fértiles que contienen protoescolices viables, (ii).CE3a (con las capas endoquísticas desprendidas hacia el interior del quiste) y CE3b (con contenido interno prácticamente sólido y con vesículas hijas), que aunque están dentro de la categoría de quistes transicionales, se ha mostrado hace poco que son normalmente viables (Hosch y cols., 2008), y (iii) CE4 y CE5 que son quistes sin actividad biológica o prácticamente nula, parcial o totalmente calcificados. Esta clasificación es de utilidad también para el seguimiento de pacientes y en la toma de decisiones sobre el tipo de tratamiento más conveniente en cada caso, como ya se ha mencionado en apartados anteriores (Eckert y Deplazes, 2004). El aspecto del quiste en cada uno de los grupos y la clasificación propuesta por la OMS (2003), en comparación con la original de Gharbi (1981), se muestran en la tabla 4.

Sin embargo, la ultrasonografía aplicada al diagnóstico de la hidatidosis también presenta desventajas, como su inaplicabilidad para la detección de quistes en otras localizaciones distintas al hígado y abdomen. Además, el diagnóstico diferencial

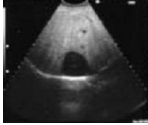
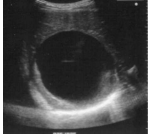


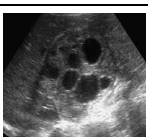
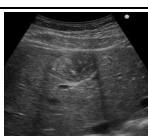
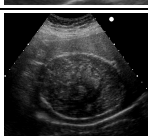
con esta técnica para lesiones con imagen similar a la de un quiste hidatídico (figura 7) es en algunos casos complicado. Su utilidad para el seguimiento de pacientes sometidos a tratamiento farmacológico puede inducir a equívoco, puesto que se ha observado que ciertas lesiones evolucionan hacia quistes potencialmente inactivos (CE4) que tras la discontinuación del tratamiento retornan a estados transicionales, ya que la ultrasonografía es todavía un método poco fino para detectar alteraciones mínimas en las membranas hidatídicas y la degeneración de la capa germinal. Por último, la detección de nuevos quistes (hidatidosis secundaria) es tardía, dependiendo de un tamaño mínimo de los quistes para poder ser detectados por esta técnica (Rigano y cols., 2002; Rogan y cols., 2006; Ben Nouir y cols., 2009; Tamarozzi y cols., 2010; Frider y Larrieu, 2010). Además de carecer en ocasiones de suficiente sensibilidad o especificidad, la ultrasonografía no está disponible en la práctica clínica de muchas zonas donde la hidatidosis es endémica o hiperendémica, especialmente en zonas deprimidas económicamente de países en vías de desarrollo.



**Figura 7.** Distintas lesiones hepáticas detectadas por ultrasonografía con un aspecto similar a un quiste hidatídico, pero de distinta etiología. a, Cirrosis; b, Hepatitis; c, Esteatosis; d, Poliquistosis; e, Hematomas; f, Absceso amebiano; g, Neoplasia; h, Hiperplasia nodular focal; i, Adenoma; j, Quistes congénitos ([www.medspain.com/cursos/curso\\_eco/leccion\\_17\\_eco.htm](http://www.medspain.com/cursos/curso_eco/leccion_17_eco.htm)).



**Tabla 4.** Comparación de las clasificaciones de Gharbi (1981) y de la OMS (2003) de imágenes ultrasonográficas de quistes hidatídicos.

GHARBI 1981	OMS 2003	IMAGEN	DESCRIPCIÓN	ESTADO
	CL		Lesión unilocular. Contenido anecoico. Pared quística no visible.	Activo
Tipo I	CE1		Lesión unilocular. Contenido anecoico. Pared quística visible.	Activo
Tipo III	CE2		Lesión multivesicular tipo "roseta". Pared quística visible.	Activo
Tipo II	CE3a		Contenido anecoico. Capa laminar desprendida y visible.	Transicional
Tipo III	CE3b		Lesión con quistes hijos de apariencia anecoica en una matriz sólida.	Transicional
Tipo IV	CE4		Lesión sin quistes hijos, Contenido hipoeicoico - hipereicoico.	Inactivo
Tipo V	CE5		Lesión con paredes calcificadas, Contenido hipereicoico.	Inactivo

Imágenes cortesía del Prof. E. Brunetti, WHO Collaborating Centre on Clinical Management of Cystic Echinococcosis, Pavia, Italia.

Por todos estos inconvenientes, la OMS recomienda el uso de una segunda prueba diagnóstica, por ejemplo una basada en la detección de anticuerpos o antígenos específicos, para la confirmación de los hallazgos por técnicas de imagen en la hidatidosis, pero no solo en estos casos dudosos, sino también para confirmar aquellos en los que la evidencia diagnóstica sea mayor (Informal Working Group, 2003).

### 1.5.2. TÉCNICAS INMUNODIAGNÓSTICAS

Como acabamos de mencionar, el inmunodiagnóstico es utilizado para aquellos pacientes en los que se detecta una imagen sugerente de quiste hidatídico, para confirmar el hallazgo. Además, este tipo de pruebas inmunológicas serían potencialmente útiles para la monitorización y el seguimiento de pacientes, y para estudios epidemiológicos (Carmena y cols., 2006).

La presencia tanto de antígenos como de anticuerpos en muestras biológicas tales como el suero en pacientes con hidatidosis, está enormemente mediatizada por la estructura del quiste hidatídico y su relación con el hospedador.

Tal y como se ha mencionado, el quiste hidatídico se aísla del hospedador a través de la capa acelular denominada laminar, que a su vez está recubierta de la capa adventicia formada por el hospedador. Estas dos capas limitan el intercambio de moléculas entre el quiste y el hospedador. Mientras que los iones son capaces de atravesar por ósmosis las capas que envuelven al quiste, no sucede igual con las macromoléculas, puesto que según varios autores, las capas quísticas presentan una permeabilidad selectiva permitiendo el paso de algunas moléculas tanto hacia el interior como hacia el exterior del quiste (Shapiro y cols., 1992; Díaz y cols., 1997). El parásito utiliza esta selectividad “secretora” para exponer moléculas al hospedador que resultan en la modulación de la respuesta inmune del mismo. La inmunomodulación encaminada a la estimulación de respuestas B policlonales T-independientes es un recurso utilizado por muchos parásitos, tanto pluricelulares como unicelulares. El metacestodo de *E. granulosus* también expone antígenos que dan lugar a este fenómeno, pertenecientes a una familia denominada antígeno B (Lightowlers y cols., 1989; Zhang y cols., 2010). Esta familia antigénica da lugar a

respuestas humorales mayoritarias, junto a otro antígeno también expuesto por el metacestodo, denominado antígeno 5 (Norman y Kagan, 1966).

Además, no solo el mantenimiento de esa permeabilidad selectiva, sino también el tipo de moléculas que el parásito sintetiza y expone dependen de la longevidad e integridad del quiste (Rogan y cols., 2006). Por ejemplo, se ha detectado que ciertos antígenos, como el denominado B2, son menos abundantes cuanto más longevo es el quiste (Pan y cols., 2011).

El inmunodiagnóstico de la hidatidosis puede ser directo, mediante técnicas que buscan antígenos específicos del parásito, o bien indirecto, mediante la detección de anticuerpos específicos contra el parásito. Así mismo, se pueden buscar otras moléculas relacionadas, como citocinas, aunque éstas son más frecuentemente detectadas para el seguimiento. Recientemente, se han realizado varias revisiones en este campo, de las cuales una de las más completas es la elaborada por Zhang y cols. (2012).

#### 1.5.2.1. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS CIRCULANTES

El *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) ha sido el test más utilizado para la detección de antígenos circulantes en pacientes con hidatidosis, y menos frecuentemente la coaglutinación (Co-A), la aglutinación de partículas de látex (LAT) y la inmunoelectroforesis (IEP).

En la tabla 5 se muestra un resumen de los ensayos más representativos que se han realizado para la evaluación de la detección de antígenos circulantes como método diagnóstico para la hidatidosis humana. Como mostramos, la mayoría de los ensayos para la detección de antígenos en hidatidosis se basan en la misma metodología, que es la detección de los antígenos mediante el uso de anticuerpos policlonales procedentes de un suero hiperinmune frente al líquido hidatídico, y poco frecuentemente se han utilizado anticuerpos monoclonales, por lo que es frecuente encontrar reactividades cruzadas con otros parásitos. La muestra clínica en la que se trata de detectar los antígenos es habitualmente el suero, aunque en ocasiones se ha ensayado esta detección en orina.

A pesar de que los tests se basan en el mismo principio, los valores de sensibilidad y especificidad encontrados son muy distintos, incluso cuando la técnica utilizada es la misma. Esta disparidad de resultados podría atribuirse, entre otros, al estadio quístico, la localización del quiste y su integridad, que como ya se ha mencionado pueden afectar a la cantidad de antígenos circulantes, información que en la mayor parte de los artículos revisados no se detalla o se encuentra solo parcialmente (Gottstein, 1984; Devi y Parija, 2003; Sadjjadi y cols., 2009).

En general estos tests no dan lugar a sensibilidades altas, por lo que su aplicación en la práctica clínica es limitada (Zhang y McManus, 2006). El alto número de falsos negativos se debe a la estructura parasitaria que impide la salida de niveles apreciables de antígenos (Larrieu y cols., 2000), así como a la formación de complejos antígeno-anticuerpo que secuestran los antígenos circulantes e impiden su detección (Craig y Nelson, 1984; Sadjjadi y cols., 2009). En este último caso, se puede realizar un tratamiento de la muestra clínica con un tampón ácido o con polietilén glicol para liberar los inmunocomplejos y concentrar los antígenos circulantes, un procedimiento especialmente indicado para los antígenos del grupo B (Zhang y cols., 2012). En algunos casos, la detección de antígenos circulantes podría representar un buen test secundario para casos sospechosos que hayan resultados negativos en pruebas de detección de anticuerpos.

También se ha investigado la utilidad de la detección de antígenos circulantes para el seguimiento de la enfermedad durante un tratamiento farmacológico o para verificar la completa curación tras una intervención quirúrgica o similar, siempre que el paciente presente un nivel de antígenos detectables a lo largo del tratamiento (p. ej., Gottstein, 1984; Ferragut y cols., 1998; Devi y Parija, 2003; Sadjjadi y cols., 2009). En esos casos, existe una marcada asociación entre el nivel de antígenos circulantes y la presencia del parásito, así como con su actividad, declinando rápidamente los niveles tras la extracción del quiste o al transformarse estos en inactivos (Craig, 1986; Ravinder y cols., 1997). Así mismo, podrían resultar útiles para detectar pacientes no curados, puesto que en casos de recurrencia tras cirugía o tratamiento farmacológico, se han detectado antígenos circulantes, mientras que en los casos no recurrentes solo fueron detectables hasta seis meses después de la curación (Ravinder y cols., 1997; Ferragut y cols., 1998).

**Tabla 4.** Ensayos realizados para el diagnóstico de la hidatidosis mediante la detección de antígenos circulantes.

MUESTRA	HID	OTRAS	SANOS	TEST	S (%)	E (%)	RC	REFERENCIA
Suero	9	--	37	ELISA sandwich (anti-LH)	44	--	--	Gottstein, 1984
Suero	68	44	25	ELISA sandwich (anti-LH)	90-50	100	Ninguna	Craig, 1986
Suero	20	65	25	ELISA sandwich (anti-8 kDa)	85	100	Ninguna	Kanwar y Vinayak, 1992
Suero	20	65	25	ELISA sandwich (anti-116 kDa)	90	100	Ninguna	Kanwar y Vinayak, 1992
Suero	46	26	23	Co-A (anti-LH)	95	89	NE	Shariff y Parija, 1993
Suero	200	--	--	ELISA sandwich (anti-Ag5 y AgB)	50	--	--	Liu y cols., 1993
Suero	54	41	69	ELISA sandwich (anti-LH)	13	100	Ninguna	Barbieri y cols., 1994
Orina	40	24	25	CIEP (anti-LH)	22	96	NE	Parija y cols., 1997
Orina concentrada	40	24	25	CIEP (anti-LH)	47	96	Sanos	Parija y cols., 1997
Suero	40	24	25	CIEP (anti-LH)	45	100	Ninguna	Parija y cols., 1997
Suero	38	72	30	ELISA sandwich (anti-LH)	45	92	As, Tn, Fc, Gi	Ferragut y cols., 1998
Orina	40	24	25	Co-A (anti-LH)	22	96	NE	Ravinder y cols., 2000
Orina concentrada	40	24	25	Co-A (anti-LH)	50	89	Sanos y NE	Ravinder y cols., 2000
Suero	40	24	25	Co-A (anti-LH)	73	94	NE	Ravinder y cols., 2000
Suero	91	25	25	LAT (anti-LH)	72	98	NE	Devi y Parija, 2003
Suero	91	25	25	Co-A (anti-LH)	83	98	NE	Devi y Parija, 2003
Suero	35	29	25	ELISA sandwich (anti-LH)	26	98	Lm	Sadjjadi y cols., 2009

Se muestran ensayos representativos. Se indica el número de sueros utilizado de pacientes con hidatidosis (HID), de pacientes con otras enfermedades (OTRAS) y de donantes sanos (SANOS) utilizados en cada caso. S (%) porcentaje de sensibilidad y E (%) porcentaje de especificidad obtenidos. RC, reacciones cruzadas. Co-A, coaglutinación; CIEP, *countercurrent immunoelectrophoresis*; LAT, aglutinación en látex; anti-LH, anticuerpos frente al líquido hidatídico; anti-8kDa y anti-116kDa, anticuerpos frente a las subunidades de 8 y 116 kDa del líquido hidatídico. Lm, leishmaniosis; Fc, fasciolosis; Tn, teniosis, As, ascariosis; Gi, giardiosis; Fi, filariosis NE, no especificado

### **1.5.2.2. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS**

El nivel de anticuerpos suele ser detectable en un porcentaje mayor de pacientes que el de antígenos. Los anticuerpos suelen ser mayoritariamente de la clase IgG, encontrándose en algunos pacientes niveles detectables de IgM, IgA e IgE (Zhang y cols., 2012). En el diagnóstico indirecto el suero es el tipo de muestra más frecuentemente utilizada, aunque existen estudios en los que se han empleado otro tipo de muestras como son la saliva y la orina. En los trabajos realizados por Sunita y cols. (2007), y Benabid y cols. (2010), los resultados obtenidos con orina y saliva son comparables a los obtenidos con el suero sanguíneo aplicando la misma técnica, un ELISA para la detección de anticuerpos IgG, según estos autores. Sin embargo, los estudios realizados con este tipo de muestras aún son escasos, por lo que su utilidad en el diagnóstico de la hidatidosis debe todavía demostrarse.

Aunque el número de pacientes con un nivel detectable de anticuerpos específicos es mayor que el de pacientes con antígenos circulantes detectables, se encuentra todavía un porcentaje de pacientes con hidatidosis que resulta negativo en todos los tests empleados hasta ahora para la detección de anticuerpos. Durante varias décadas, se han llevado a cabo numerosos trabajos tratando de mejorar la sensibilidad, y también la especificidad de este tipo de tests indirectos. Algunos se han centrado en la comparación de diferentes técnicas, otros en la detección de inmunoglobulinas diferentes y otros estudios en el uso de distintos antígenos.

En cuanto a las técnicas empleadas, la serología en el diagnóstico de la hidatidosis tiene una larga historia y casi todos los tests serológicos han sido utilizados para el diagnóstico de casos humanos. Entre los diferentes tests se han encontrado diferencias considerables en cuanto a especificidad y sensibilidad (Zhang y McManus, 2006; Zhang y cols., 2012).

En todos los trabajos realizados en los que se compara la utilidad de distintas técnicas clásicas en el diagnóstico, el ELISA ha resultado ser la más sensible (p. ej., Orduña y cols., 1985; Babba y cols., 1994; Sbihi y cols., 2001). Por ello, casi todos los métodos tradicionales de inmunodiagnóstico, como son el test intradérmico de Cassoni, el test de fijación del complemento, la inmunofluorescencia indirecta, la inmunoelectroforesis, la aglutinación de partículas de látex y la hemaglutinación

indirecta, han dejado de utilizarse para el diagnóstico de la hidatidosis (Zhang y cols., 2012). Las técnicas que de manera más frecuente son aplicadas hoy día en los laboratorios de diagnóstico son el ELISA y el inmunoblot (IB) (Moro y Schantz, 2009; Feng y cols., 2010). El ELISA, por su sensibilidad, se recomienda como técnica de elección para el diagnóstico y seguimiento, quedando el IB como test confirmatorio, ya que esta técnica se considera más específica (Verastegui y cols., 1992; Nasrieh y Abdel-Hafez, 2004).

Sin embargo, el ELISA y el IB son técnicas complejas, largas, que requieren de un cierto equipamiento, reactivos caros y de personal entrenado. Estos costes no pueden ser asumidos en muchas zonas en las que la hidatidosis es endémica. Con el fin de reducir la complejidad y coste de cada análisis se está trabajando en el desarrollo de nuevas técnicas que en general tratan de abaratar y acortar los métodos analíticos usando dispositivos simples. La tecnología denominada *lateral flow immunochromatographic assay* (LFIA), más conocida como inmunocromatografía, ha sido aplicada a numerosos tests para la detección de patógenos, drogas, hormonas y metabolitos, abarcando campos muy diferentes. Estos tests consisten en una tira prefabricada conteniendo los reactivos secos que serán activados mediante la aplicación de la muestra fluida. Como señal para la visualización del resultado del test se utilizan partículas de oro o de látex coloreadas a las que se unirá la molécula de interés mediante interacciones bioespecíficas. Los resultados pueden obtenerse entre 10 y 20 minutos (Posthuma-Trumpie y cols., 2009). Tras una serie de artículos encaminados a la comparación y optimización de métodos serodiagnósticos para la hidatidosis, el equipo del Prof. Osuna desarrolla un test para el diagnóstico de la hidatidosis basado en la inmunocromatografía (Sbihi y cols., 2003). Este test detecta anticuerpos específicos frente al líquido hidatídico en 3 minutos, consiguiendo una sensibilidad y especificidad similar a la obtenida con un ELISA empleando los mismos reactivos.

Otros tests simples son los basados en el dot-ELISA. Son de destacar los resultados de Feng y cols. (2010) sobre 857 sueros utilizando un test basado en esta técnica, introduciendo como novedad la ausencia de una reacción enzimática, utilizando como marcaje una partícula coloidal de oro conjugada con una anti-IgG humana, siendo el tiempo de desarrollo del test de 3 minutos, con una sensibilidad

del 80,7%. Otros tests rápidos han sido utilizados para el diagnóstico de la hidatidosis, como los basados en biosensores (Kasahara y Ashihara, 1997) o en el uso de dispositivos microfluídicos (Pereira y cols., 2011).

Si nos referimos a la utilidad diagnóstica comparada de la detección de distintos isotipos de anticuerpos, es necesario comenzar mencionando que la detección de inmunoglobulinas G, M, E y A en pacientes con hidatidosis ha sido ensayada en varios trabajos, normalmente mediante la técnica ELISA, llegando todos a la conclusión de que la detección de IgG da lugar a tests más sensibles, ya que parece ser la inmunoglobulina más abundante en los casos de hidatidosis, seguida por la IgM y después por la IgE (p. ej. Zarzosa y cols., 1999). También los diferentes autores coinciden en que la detección de inmunoglobulinas como la IgM, IgE e IgA podría ser útil en el seguimiento de pacientes en los que estos isotipos disminuirían a lo largo del tiempo tras la curación (p. ej., Craig, 1986; Sbihi y cols., 1997; Zarzosa y cols., 1999; Manterola y cols., 2007), aunque su utilidad está limitada dado el número limitado de pacientes que presentan estos isotipos a un nivel detectable (Craig, 1986; Orduña y cols., 1992; Zarzosa y cols., 1999; Doiz y cols., 2002). La detección de una bajada en estos isotipos para aseverar la curación de un paciente con hidatidosis tras tratamiento queda, de todos modos, limitada por su persistencia incluso tres años o más después de la curación (Zarzosa y cols. 1999; Bulut y cols., 2001; Doiz y cols., 2002). Además la IgA quedaría restringida al uso de muestras diferentes al suero sanguíneo ya que es más abundante en secreciones, como la saliva (Sbihi y cols., 1997; Benabid y cols., 2010).

Dentro del isotipo IgG, también se ha evaluado el valor diagnóstico de los sub-isotipos IgG1 a IgG4, siendo las sensibilidades menores a la conseguida con IgG total. Aunque se descarta su uso para el diagnóstico, la detección de sub-isotipos concretos se ha postulado como útil en el seguimiento de la enfermedad, ya que según algunos autores, ciertos sub-isotipos como el 1 y el 4 están relacionados con el estado del quiste y con su evolución, y específicamente la bajada del sub-isotipo IgG4 podría significar curación (Wen y Craig, 1994; Riganò y cols., 1995, 2002; Shambesh y cols., 1997; Daeki y cols., 2000; Margutti y cols., 2008; Delunardo y cols., 2010), aunque su uso queda así mismo limitado por el bajo número de pacientes que presentan un nivel detectable de este sub-isotipo antes de la intervención.



La fuente de material antigénico va a ser un punto crucial en el inmunodiagnóstico de la hidatidosis (Siracusano y cols., 2009). Los antígenos que se han utilizado son principalmente el líquido hidatídico (LH) o mezclas antigénicas parcialmente purificadas del mismo, y ocasionalmente se han probado otras fuentes como extractos somáticos de protoescolices y vermes adultos, productos de excreción-secreción, y extractos de oncosferas (Carmena y cols., 2006). En general, el uso de estas mezclas antigénicas crudas presenta problemas de reactividad cruzada con pacientes con otras parasitosis, especialmente cisticercosis e hidatidosis alveolar, debidos a *Taenia solium* y a *E. multilocularis*, respectivamente, disminuyendo mucho la especificidad del test. Así mismo, se encuentra un porcentaje de pacientes que resulta negativo a estos extractos, dando lugar a sensibilidades mejorables. Otro problema que presentan los extractos crudos parasitarios es la imposibilidad de estandarización, por la variabilidad de un extracto a otro, lo que hace que los resultados obtenidos en distintos laboratorios puedan ser muy diferentes entre sí (Tawfeek y cols., 2011).

Tal y como acabamos de mencionar, el LH ha sido la principal fuente de antígenos utilizada para el diagnóstico primario y también para el seguimiento de pacientes (p. ej., Ortona y cols., 2003; Carmena y cols., 2006) El LH consiste en una mezcla compleja de glico y lipoproteínas, carbohidratos y sales. Algunos de sus componentes proceden del hospedador, como albúmina e inmunoglobulinas, y otros son el resultado de la actividad metabólica del metacestodo (Carmena y cols., 2006). El LH procedente de quistes fértiles de oveja ha sido usado rutinariamente en la preparación y estandarización del antígeno, aunque también se ha utilizado como fuente antigénica alternativa LH de quistes bovinos y de camello (Zhang y cols., 2003). La fertilidad, viabilidad de protoescolices y procedencia del quiste pueden afectar a la reactividad inmunológica del LH (Carmena y cols., 2006).

El uso en clínica de LH crudo presenta sensibilidades muy variables, siempre con un rango de pacientes que resulta negativo en cuanto a la presencia detectable de anticuerpos específicos (tabla 5). La falta de especificidad es uno de los principales problemas al utilizar LH para el diagnóstico, puesto que da lugar a reacciones cruzadas y falsos positivos con otras parasitosis, y con otras patologías infecciosas y

no infecciosas, e incluso con un porcentaje de donantes sanos (tabla 5) (Eckert y Deplazes, 2004; Carmena y cols., 2006).

En cuanto a los extractos somáticos de protoescolices y vermes adultos, aunque han mostrado una buena sensibilidad, dan lugar a muchos falsos positivos, resultando en una especificidad muy baja (tabla 5).

El LH ha sido también, como ya mencionamos, la principal fuente antigénica empleada en los estudios de seguimiento para la detección de anticuerpos específicos. Sin embargo, tanto este antígeno como otros extractos parasitarios crudos no resultan útiles para definir curación, puesto que los correspondientes anticuerpos son persistentes, pudiendo llegar a quedar como residuales durante más de diez años (p. ej., Hernández-González y cols., 2008). Sí se ha mencionado por algunos autores que determinadas bandas antigénicas del LH desaparecen más rápidamente que otras al ser enfrentadas a sueros de pacientes en seguimiento por la técnica de IB (Doiz y cols., 2001 para las bandas de 39 y 42 kDa; Gadea y cols., 2000, para la de 145 kDa, y Celik y cols., 2009, para las bandas de 29 y 205 kDa). Sin embargo, no se han realizado más estudios para su completa caracterización.

Si nos referimos al uso de antígenos purificados nativos, la mayoría de los estudios se han centrado en el uso de las lipoproteínas antigénicas B (AgB) y 5 (Ag5), componentes mayoritarios y altamente inmunogénicos del LH (Siracusano y cols., 2009).

**Tabla 5.** Ensayos realizados para el diagnóstico de la hidatidosis mediante la detección de anticuerpos IgG frente a extractos antigénicos crudos y a fracciones nativas purificadas de *Echinococcus granulosus*.

ANTÍGENO	HID	OTRAS	SANOS	TEST	S (%)	E (%)	RC	REFERENCIA
LH	111 (H)	0	0	ELISA	89	--	--	Babba y cols., 1994
LH	122 (P)	0	0	ELISA	78	--	--	Babba y cols., 1994
LH	90	88	28	ELISA	84	60	AE, Cc, HI	Barbieri y cols., 1998
LHOv	35	339	200	ELISA	91	82	AE, Sch, Cc, Fc, Nm, otros	Poretti y cols., 1999
LHBo	52	339	200	ELISA	96	82	AE, Sch, Cc, Fc, Nm, otros	Poretti y cols., 1999
LH(pp)	119	54	37	LA	86	88	AE, Cc, Tx, FI	Barbieri y cols., 1993
LH(pp)	70	73	30	ELISA	89	41	AE, Cc, otros	Jiang y cols., 2001
LH(5+B)	204	53	90	ELISA	72	97	Cc, Sch	Ortona y cols., 2000
LH(5+B)	204	53	90	IHA	54	100	Ninguna	Ortona y cols., 2000
LH(5+B)	204	53	90	IEP	31	100	Ninguna	Ortona y cols., 2000
LH(5+B)	204	53	90	IB (Ige)	80	96	Cc, otros	Ortona y cols., 2000
SAd	137	28	11	ELISA	82	65	Cc, Tn	Ersfeld y cols., 1997
SPx	137	28	11	ELISA	90	48	Cc, Tn	Ersfeld y cols., 1997
SPx	147	88	60	ELISA	90	57	AE, Try	Rafiei y Craig, 2002

Se muestran ensayos representativos. Se indica el número de sueros utilizado de pacientes con hidatidosis (HID), de pacientes con otras enfermedades (OTRAS) y de donantes sanos (SANOS) utilizados en cada caso. S (%) porcentaje de sensibilidad y E (%) porcentaje de especificidad obtenidos. RC, reacciones cruzadas. LHOv, líquido hidatídico ovino; LHBo, líquido hidatídico bovino; LH(5+B), fracción del LH enriquecida en Ag5 y AgB; LH(pp), LH parcialmente purificado; SAd, extracto somático de vermes adultos; SPx, extracto somático de protoescolices. H-hígado; P-pulmón. LA-agutinación de partículas de látex; IHA-hemaglutinación indirecta; IEP, inmunoelectroforesis; IB, inmunoblot. Reacciones cruzadas: AE-hidatidosis alveolar; Cc-cisticercosis; Sch-esquistosomosis; Fc-fasciolosis; Tx-toxocartosis; FI-filariosis; Nm-nematodosis; Try, tripanosomosis, HI, helmintosis; Otros, otras parasitosis o enfermedades

El antígeno B es una lipoproteína polimérica termoestable de 160 kDa (Mamuti y cols., 2006). En SDS-PAGE, se disocia en varias subunidades de pesos moleculares de 8, 16, 24 y 32 kDa, y cada una de ellas a su vez está compuesta por una serie de diferentes subunidades de 8 kDa. Se han encontrado moléculas similares en otros miembros de la familia Taeniidae (pfam05596), incluyendo *E. multilocularis* (Mamuti y cols., 2004). Hasta la fecha, en *E. granulosus* se han identificado hasta 5 isoformas distintas, denominadas AgB8/1 a /5 (Pan y cols., 2010), codificadas por una familia multigénica (Zhang y cols., 2010). Las subunidades B1 y B2 han sido las más estudiadas en relación al diagnóstico.

En los ensayos llevados a cabo con el AgB nativo purificado se han obtenido valores de sensibilidad comprendidos entre el 60 y el 95% para la detección de IgG total en ELISA, y del 60 al 92% cuando se utiliza el inmunoblot (tabla 6), bajando estas cifras hasta un 38% cuando se detectan sub-isotipos de IgG. La detección de sub-isotipos no aumenta en ningún caso la sensibilidad en las pruebas realizadas en las mismas condiciones para IgG total (tabla 6). En cuanto a la especificidad, esta oscila entre el 65 y el 100%, haciéndose mayor en general cuando la sensibilidad disminuye. Las reacciones cruzadas mayoritarias se detectan con sueros de pacientes con hidatidosis alveolar y cisticercosis (tabla 6).

El Ag5 es un complejo lipoproteico de alto peso molecular (aproximadamente 400 kDa), que en condiciones reductoras se disocia en subunidades de pesos moleculares 38 y 22-24 kDa (Zhang y cols., 2003). También se encuentran moléculas similares en otros miembros de la familia Taeniidae, como por ejemplo *E. multilocularis* (Siles-Lucas y cols., 1998) y *Taenia solium* (Rueda y cols., 2011). En su forma purificada el Ag5 ha dado lugar a sensibilidades comprendidas entre 50-83% y especificidades entre 89-97% (tabla 6), en general aparentemente por debajo de las sensibilidades obtenidas con los mismos sueros utilizando el antígeno B nativo. También presenta reacciones cruzadas con sueros de pacientes infectados con otros cestodos, trematodos y nematodos (tabla 6; Carmena y cols., 2006).

Los antígenos B y 5 nativos purificados también se han testado para el seguimiento. El porcentaje de pacientes positivos va disminuyendo con el tiempo, de forma más rápida que con los antígenos crudos (Doiz y cols. 2002; Nasrieh y Abdel-Hafez. 2004; Ben Nouir y cols. 2008a; Celik y cols. 2009). Ben Nouir y cols. (2008a)

observaron que en pacientes curados tras una cirugía las bandas de 8 y 16 kDa en inmunoblot correspondientes al antígeno B iban desapareciendo gradualmente. Sus resultados muestran que solo un 14,3% de los sueros de pacientes curados tras 4 años de la cirugía aún eran positivos y que a los 5 años todos ellos negativizaron frente a estas bandas antigénicas. Sin embargo, los sueros de pacientes que mostraron relapsos fueron siempre positivos durante los 5 años de seguimiento. Los mismos sueros fueron testados en ELISA frente a LH completo, observándose una tendencia a la disminución del porcentaje de positivos en pacientes curados, sin embargo en el punto final del seguimiento (5 años) el 57.1% seguían siendo positivos.

En general, los antígenos nativos, tanto crudos como purificados, dan lugar a resultados extremadamente variables, variabilidad que vendrá determinada, entre otros, por la dificultad de su estandarización, puesto que deben ser obtenidos de infecciones naturales y cada lote tendrá una composición diferente. Esta variabilidad también puede ser atribuida en el caso de antígenos purificados a la falta de un consenso en cuanto a los métodos de purificación de determinados antígenos.

Con el fin de solucionar los problemas de estandarización antigénica, y tratar de mejorar la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico serológico, se ha trabajado en la producción de antígenos recombinantes. Éstos pueden ser diseñados y obtenidos en grandes cantidades, de una forma estandarizada y homogénea, a partir de bacterias *Escherichia coli* que hayan sido transformadas con un plásmido que codifique un antígeno o fragmento(s) antigénico(s) determinado del parásito. Con los mismos objetivos, se han producido y ensayado algunos péptidos sintéticos derivados de secuencias antigénicas de *E. granulosus*.

**Tabla 6.** Ensayos realizados para el diagnóstico de la hidatidosis mediante la detección de anticuerpos frente antígenos 5 y B purificados nativos de *Echinococcus granulosus*. (Continúa en la página siguiente).

ANTÍGENO	HID	OTRAS	SANOS	TEST	S (%)	E (%)	RC	REFERENCIA
nAgB	81	98	--	IgG ELISA	89	86	AE	Wen y Craig, 1994
				IgG1 ELISA	58	92		
				IgG2 ELISA	53	94		
				IgG3 ELISA	46	95		
				IgG4 ELISA	73	91		
nAg5	133	--	--	IgG ELISA	83	--	--	Babba y cols., 1994
nAgB	210	79	47	IgG ELISA	93	65	AE, Cc, Sch	McVie y cols., 1997
				IgG4 ELISA	63	81		
nAgB	191	133	50	IgG ELISA	79	98	Cc	Shambesh y cols., 1997
				IgG1 ELISA	57	100		
				IgG4 ELISA	38	99		
nAgB	90	88	28	IgG ELISA	77	86	AE	Barbieri y cols., 1998
nAg5	39	51	29	IgG ELISA	54	89	AE	Gonzalez y cols., 2000
nAgB	204	53	90	IgG ELISA	74	100	Ninguna	Ortona y cols., 2000
				IgG IB	66	100		
nAgB	90	86	28	IgG ELISA	77	85	AE	Gonzalez-Sapienza y cols., 2000
nAgB	31	87	29	IgG ELISA	77	82	AE, Sch, Tx	Rott y cols., 2000
nAgB	78	24	15	IgG ELISA	94	90	Sch, Ds	Sbibi y cols., 2001

Se muestran ensayos representativos. Se indica el número de sueros utilizado de pacientes con hidatidosis (HID), de pacientes con otras enfermedades (OTRAS) y de donantes sanos (SANOS) utilizados en cada caso. S (%) porcentaje de sensibilidad y E (%) porcentaje de especificidad obtenidos. RC, reacciones cruzadas. nAgB, antígeno B nativo. nAg5, antígeno 5 nativo (celdas con fondo gris). IB, inmunoblot. Reacciones cruzadas: AE, hidatidosis alveolar; Cc, cisticercosis; Fc, fasciolosis; FI, filariosis; L, leishmaniosis; Sch, esquistosomosis; Tp, toxocarosis; Tx, toxoplasmosis; Ds, distomatosis; otros; otras parasitosis o enfermedades.

**Tabla 6.** Ensayos realizados para el diagnóstico de la hidatidosis mediante la detección de anticuerpos frente antígenos 5 y B purificados nativos de *Echinococcus granulosus*. (Continuación)

ANTÍGENO	HID	OTRAS	SANOS	TEST	S (%)	E (%)	RC	REFERENCIA
nAgB	56	21	15	IgG ELISA	95	86	Cc, Sch, L	Sbhi y cols., 2003
nAgB	129	65	203	IgG ELISA	60	93	Cc, Tx.	Virginio y cols., 2003
nAgB	59	55	15	IgG ELISA	80	77	AE, Cc	Lorenzo y cols., 2005a
nAgB	324	502	70	IgG IB	84	95	Cc, Sch, otros	Li y cols., 2003
nAgB	173	181	29	IgG IB	92	71	AE	Ito y cols., 1999
nAgB	40	34	20	IgG ELISA	87	94	Fc, Tp	Tawfeek y cols., 2011
				IgG4 ELISA	80	83,3		
				IgG ELISA	82	91		
nAgB/12kDa	40	34	20	IgG4 ELISA	82	83		

Se muestran ensayos representativos. Se indica el número de sueros utilizado de pacientes con hidatidosis (HID), de pacientes con otras enfermedades (OTRAS) y de donantes sanos (SANOS) utilizados en cada caso. S (%) porcentaje de sensibilidad y E (%) porcentaje de especificidad obtenidos. RC, reacciones cruzadas. nAgB, antígeno B nativo. nAg5, antígeno 5 nativo (celdas con fondo gris). IB, inmunoblot. Reacciones cruzadas: AE, hidatidosis alveolar; Cc, cisticercosis; Fc, fasciolosis; FI, filariosis; L, leishmaniosis; Sch, esquistosomosis; Tp, toxocariosis; Tx, toxoplasmosis; Ds, distomatosis; otros; otras parasitosis o enfermedades.

La mayor parte de estas nuevas moléculas se derivan de los antígenos B y 5, y algunos derivan de genotecas de expresión preparadas a partir de protoescólices (Zhang y cols. 2003, 2012; Carmena y cols., 2006).

Los resultados obtenidos tanto con proteínas recombinantes como con péptidos sintéticos son también muy variables, de modo que utilizando el mismo antígeno, se obtienen sensibilidades y especificidades que oscilan en un rango de valores muy amplio (tabla 7). Sin embargo, se observan tendencias claras que apuntan a dos de los recombinantes (AgB8/2 y EpC1-GST) como los que presentan, en términos generales, mejor rendimiento diagnóstico.

Al ser utilizado en forma de antígeno recombinante, el AgB da lugar a sensibilidades y especificidades variables, consiguiéndose las cifras más elevadas en general con la subunidad B2, en comparación con la subunidad B1 y otras subunidades no definidas (tabla 7), mostrando además una eficiencia diagnóstica que aparentemente es mayor que la del AgB nativo, con una sensibilidad próxima al 90% y una especificidad similar (Virginio y cols., 2003). El uso de una versión truncada de dicha proteína recombinante, que ha sido desarrollada por nuestro grupo, denominada AgB2t (Hernández-González y cols., 2008), da lugar a resultados diagnósticos similares a los encontrados por estos y otros autores para la molécula recombinante completa (ver tabla 7). Sin embargo, el uso de péptidos sintéticos derivados de esta subunidad del antígeno B y obtenidos por otros autores no mejoran los resultados obtenidos con las moléculas completa o truncada, sino al contrario, puesto que muestran valores de sensibilidad mucho menores que las mismas (tabla 7). Ya que los péptidos diseñados abarcan en conjunto toda la longitud de la secuencia aminoacídica de la subunidad B2, esta diferencia puede deberse a que los antígenos recombinantes en comparación con los péptidos sintéticos contienen un gran espectro de epítomos que cubren las variaciones en las respuestas individuales entre pacientes (González-Sapienza y cols., 2000). Además, distintos trabajos indican que la estructura total del antígeno va a ser importante en el reconocimiento por los anticuerpos (p. ej., Barbieri y cols., 1998; Rott y cols., 2000). Según esto, una de las causas del bajo rendimiento diagnóstico de epítomos individuales podría ser la pérdida de epítomos conformacionales que se produce siempre que la secuencia de aminoácidos está fuera del entorno proporcionado por el resto de la molécula de



proteína (Rott y cols., 2000). También se ha descrito que los péptidos pequeños y medianos son propensos a asumir conformaciones en medio líquido que pueden impedir la unión de los anticuerpos, favoreciéndose ésta cuando la conformación es alfa-hélice (Barbieri y cols. 1998).

Los resultados que muestran una alta especificidad y sensibilidad para el antígeno B2 no son mejorados cuando se emplea como recombinante el antígeno 5 o péptidos derivados del mismo (tabla 7). Así, se han evaluado dos formas recombinantes del Ag5 (rAg5 y rAg5-38s), que muestran no solo peores resultados que el recombinante B2, sino que también resultan en un marcado descenso de la validez diagnóstica con respecto al antígeno 5 original. El péptido sintético p89-122 es un epítipo del Ag5 que ha sido ensayado en diferentes trabajos, obteniéndose sensibilidades muy variables que van desde un 16% a un 85%, y especificidades también muy variables (tabla 7).

La mayor parte del resto de los antígenos recombinantes obtenidos y ensayados derivan de protoescólices (tabla 7). Entre ellos, algunos han mostrado puntualmente sensibilidades similares a las del recombinante B2, por ejemplo la malato deshidrogenasa (Virginio y cols., 2003), sin embargo esos resultados no son los mismos que los obtenidos por otros autores anteriormente utilizando el mismo recombinante (Ferreira y Zaha, 1994). Esas diferencias pueden ser atribuidas a variables relacionadas con el estado quístico y a determinadas variables clínicas, que no son detalladas por cada autor para los correspondientes paneles de sueros.

Finalmente, la proteína recombinante EpC1-GST, también procedente de protoescólices, así como un fragmento de la misma, han sido ensayados en varias ocasiones (Li y cols., 2003, 2004; Zhang y cols., 2007), presentando una alta sensibilidad y especificidad. Estos trabajos muestran el uso de un panel de sueros restringido, y el antígeno solo ha sido testado en un laboratorio, sin tener una confirmación posterior de su utilidad. Los valores de sensibilidad y especificidad de cada antígeno se muestran enormemente dependientes del panel de sueros utilizado, o más bien de determinadas características clínicas de los pacientes de los que provienen, ya que estos valores varían al cambiar el panel de sueros, como ocurre en el caso de la proteína rEgcMDH, cuyo valor de sensibilidad varía de un estudio a otro del 90 al 45% (tabla 7).

En un trabajo reciente, Jiang y cols. (2012) comparan cinco de las subunidades del antígeno B recombinante para el diagnóstico de pacientes con hidatidosis detectando distintos sub-isotipos de IgG. Concluyen que, bajo sus condiciones de ensayo, el antígeno B1 es el más sensible (tabla 7). Este estudio, sin embargo, tampoco detalla las variables clínicas de los pacientes que se incluyen en el estudio, que fueron elegidos por su positividad frente al líquido hidatídico.

En general, podemos comentar a tenor de los resultados obtenidos con este tipo de preparaciones antigénicas, que todavía se encuentra un porcentaje de pacientes con hidatidosis que es negativo frente a todos ellos, probablemente debido a varios factores, por ejemplo los relacionados con la clínica del paciente. La influencia de alguna de estas variables clínicas sobre la serología específica en pacientes con hidatidosis, como el número de quistes, la localización de los mismos, el estadio quístico según la clasificación del IWGE y la fecha de recogida del suero en relación a la de tratamiento, ya se ha señalado por diversos autores (p. ej. Babba y cols., 1994; Ortona y cols., 2000; Gavidia y cols., 2008; Feng y cols., 2010; Li y cols., 2010). Estas variables son raramente mencionadas en los trabajos que evalúan herramientas serológicas, y cuando lo son, generalmente no se realiza una evaluación de la influencia de todos los posibles factores en conjunto, sino de alguno de ellos individualmente.

Otro de los factores que puede hacer cambiar sustancialmente la sensibilidad de un test determinado es la composición del antígeno seleccionado. En este aspecto, el aumento de sensibilidad de herramientas diagnósticas para la detección de anticuerpos, utilizando antígenos recombinantes, se ha mostrado posible para otras parasitosis mediante la modificación de los recombinantes para aumentar su reactividad inmunológica. Este aumento se puede conseguir, entre otros, multiplicando el número de unidades antigénicas que se incluyen en un determinado antígeno recombinante. A este respecto, se ha descrito que la clonación en repetición de unidades antigénicas en tándem da lugar a antígenos recombinantes con mayor reactividad cuanto mayor es el número de subunidades. Algunos ejemplos de este aumento de reactividad se encuentran en los recombinantes en tándem obtenidos para el diagnóstico de la leishmaniosis y la tripanosomosis (Goto y cols., 2010; Valiente-Gabioud y cols., 2011). Esta alternativa para el potencial aumento de

reactividad de los antígenos recombinantes para detectar anticuerpos específicos no se ha empleado nunca en el caso del diagnóstico de la hidatidosis.

Otras variables que pueden influir en los resultados dispares son los distintos criterios a la hora de establecer un valor de corte, así como el uso de diferentes tratamientos estadísticos para determinar la sensibilidad y especificidad de un test, que pueden dar lugar a una variación de los resultados aunque se parta de los mismos datos en origen (Lorenzo y cols., 2005a).

Así mismo, se puede deducir de los datos publicados que existen reacciones cruzadas menos prominentes cuando se utilizan reactivos recombinantes, en comparación con el uso de antígenos nativos, aunque se siguen observando falsos positivos, especialmente con sueros de pacientes con hidatidosis alveolar y con cisticercosis.

En conclusión, los datos muestran varios antígenos recombinantes con buen potencial, pero los resultados son enormemente variables, lo que sugiere que es totalmente necesaria una evaluación sistemática, teniendo en cuenta las variables que puedan afectar a la positividad serodiagnóstica de los pacientes con hidatidosis frente a dichos antígenos o a otros que puedan ser desarrollados en un futuro, para poder definir claramente los mejores candidatos diagnósticos.

**Tabla 7.** Antígenos recombinantes y péptidos sintéticos utilizados en el serodiagnóstico de la hialitosis en humanos.

ANTÍGENO	HID	OTRAS	SANOS	TEST	S (%)	E (%)	RC	REFERENCIA
EG55-GST	64	105	39	IgG ELISA	89	72	AE	Helbig y cols., 1993
EgPS3-GST	119	123	44	IgG ELISA	74	87	AE, Sch	Leggatt y McManus, 1994
AgB-MBP	210	79	47	IgG ELISA	74	88	AE	McVie y cols., 1997
					65	91		
AgB8/1	204	53	90	IgG IB	72	100	Ninguna	Ortona y cols., 2000
AgB8/1	31	87	29	IgG ELISA	55	80	AE, Sch, Tx	Rott y cols., 2000
AgB8/2					84	98	Sch, Tx	
AgB8/1	129	65	203	IgG ELISA	84	91	Cc	Virginio y cols., 2003
AgB8/2					93	99	Cc, Tx	
AgB8/1	59	55	15	IgG ELISA	68	88	AE, Cc	Lorenzo y cols., 2005a
AgB8/2					45	86		
p176 (AgB8/1)					63	83		
AgB8/1t	30	20	20	IgG ELISA	83	87	AE, Cc, Sch, Fc	Hernández-González y cols., 2008
AgB8/2t	102	68	95		91	93	Cc, Sch, Fc, mix	
AgB8/1	246	173	--	IgG ELISA	78	15	AE	Li y cols., 2010
AgB8/1	124	119	--	IgG ELISA	83	74	AE, Cc	Jiang y cols., 2012
AgB8/2					63	72		
AgB8/3					29	76		
AgB8/4					76	73		
AgB8/5					41	86		
p65 (AgB8/1)	25	8	9	IgG d-ELISA	64	100	Ninguna	Leggatt y McManus, 1994
p65 (AgB8/1)	90	88	28	IgG ELISA	40	90	AE, On, Sch, Tx	Barbieri y cols., 1998
pGU4 (AgB8/2)					18	98	AE	

**Tabla 7.** Antígenos recombinantes y péptidos sintéticos utilizados en el serodiagnóstico de la hidatidosis en humanos (cont.).

ANTÍGENO	HID	OTRAS	SANOS	TEST	S (%)	E (%)	RC	REFERENCIA
p65 (AgB8/1)					44	96		
p176 (AgB8/1)					80	93		
p175 (AgB8/2)	90	86	28	IgG ELISA	49	94	AE, Sch, Tx	González-Sapienza y cols., 2000
p177 (AgB8/2)					38	92		
pGU4 (AgB8/2)					18	98		
pGU4 (AgB8/2)	20	--	--	IgG ELISA	40	--	--	Rotty cols., 2000
plongD8-9 (AgB8/1*)	35	149	50	IgG ELISA	40	81	AE, Cc, St, Sch, otros	List y cols., 2010
Ag5					65	89	AE, Cc	Lorenzo y cols., 2005b
Ag5-38 kDa	34	36	18	IgG ELISA	21	97	AE	
p89-122 (Ag5)	40	52	10	IgG, A, M ELISA	85	86	AE	Chamekh y cols., 1992
p89-122 (Ag5)	90	88	28	IgG ELISA	16	100	Ninguna	Barbieri y cols., 1998
p89-122 (Ag5)	39	51	29	IgG ELISA	44	100	Ninguna	Gonzalez y cols., 2000
Ag4-GST (cMDH)	28	29	28	IgG ELISA	54	83	Sch, Fl	Ferreira y Zaha, 1994
				IgG IB	42	93	Otros	
EgEF-1 $\beta$ / $\delta$	60	30	9	IgG4 IB	18	100	Ninguna	Margutti y cols., 1999
				IgE IB	52	95	Otros	
Eg $\alpha$ MDH					90	95	Cc	
EgCaBP2	129	65	203	IgG ELISA	84	97	Cc, Tx	Virginio y cols., 2003
EgAFFPt					59	96	Cc, Tx	
EgAFFPf					69	100	Ninguna	
EpC1-GST	116	492	70	IgG IB	92	96	AE, Cc, Sch, S, otros	Li y cols., 2003

**Tabla 7.** Antígenos recombinantes y péptidos sintéticos utilizados en el serodiagnóstico de la hidatidosis en humanos (cont.).

ANTÍGENO	HID	OTRAS	SANOS	TEST	S (%)	E (%)	RC	REFERENCIA
EgG5-GST	23	138	20	IgG IB	61	70	AE, Cc, S, otros	Li y cols., 2004
EgMDH	59	55	15	IgG ELISA	45	83	AE, Cc	Lorenzo y cols., 2005a
P5-GST (EpC1)	60	6	--	IgG IB	97	100	Ninguna	Zhang y cols., 2007
EgTPx	101	36	40	IgG ELISA	83	92	AE, Sch, St	Margutti y cols., 2008
E14t	102	68	95	IgG IB	42	92	Sch, mix	Hernández-González y cols., 2008
C317				IgG ELISA	60	59		
Eg19	97	58	37	IgG IB	10	100	Ninguna	Delunardo y cols., 2010

Se muestran ensayos representativos. Se indica el número de sueros utilizado de pacientes con hidatidosis (HID), de pacientes con otras enfermedades (OTRAS) y de donantes sanos (SANOS) utilizados en cada caso. S (%) porcentaje de sensibilidad y E (%) porcentaje de especificidad obtenidos. RC, reacciones cruzadas. IB, inmunoblot.

EG55-GST y EgPS3, subunidad de 8kDa del antígeno B y fragmento del antígeno B unidos a la glutatona-S-transferasa; MBP, proteína de unión a maltosa; AgB8/1t y /2t, subunidades B1 y B2 del antígeno B truncadas (ver Hernández-González y cols., 2008); p, péptido sintético, para los que se indica la molécula madre entre paréntesis; AgB8/1\*, subunidad B1 del antígeno B de *Echinococcus multilocularis*; cMDH, malato deshidrogenasa citosólica; EgEF-1 $\beta$ / $\delta$ , factor de elongación 1 $\beta$ / $\delta$ ; EgCaBP2, proteína de unión a calcio; EgAFFF(t), proteína fragmentante de actina (truncada); EgAFFFp, proteína fragmentante de actina completa; EpC1, espectrina; P5, fragmento de EpC1 o espectrina; EgG5, desconocida; EgTPx, tioredoxina peroxidasa; E14t, fragmento de la proteína 14-3-3; C317, desconocida; Eg19, desconocida.

Reacciones cruzadas: AE, hidatidosis alveolar; Cc, cisticercosis; Fc, fasciolosis; Fl, filariosis; L, leishmaniosis; Sch, esquistosomosis; St, estromboloidiasis; Tn, teniosis; Tp, toxoplasmosis; Try, tripanosomiasis; Tx, toxocariosis; mix, infecciones mixtas; otros, otras parasitosis o enfermedades; S, sanos.

En cuanto al seguimiento de pacientes curados tras la cirugía, se ha encontrado utilidad potencial para un número limitado de antígenos recombinantes. La subunidad B1 del antígeno B fue utilizada en su forma recombinante por Li y cols. (2010) para un estudio epidemiológico, encontrando estos autores que la mayoría de los pacientes con lesiones inactivas tipo CE4 y CE5 no presentaban anticuerpos específicos frente a este antígeno. La potencialidad de este antígeno para el seguimiento de pacientes curados, aunque en su forma nativa, es también señalada por Ben Nouir y cols. (2008a), que encuentran una disminución considerable del porcentaje de pacientes positivos a lo largo del tiempo tras la curación frente a las subunidades del antígeno B presentes en el líquido hidatídico por inmunoblot. De forma similar, el antígeno recombinante B2t descrito por nuestro grupo demostró que este componente antigénico resulta útil para el seguimiento, puesto que los anticuerpos específicos detectados en ELISA declinaban a lo largo del tiempo en pacientes curados, mientras que los anticuerpos frente al líquido hidatídico permanecían a pesar de la curación (Hernández-González y cols., 2008). También se ha detectado una regresión progresiva del nivel de anticuerpos específicos en pacientes curados tras cirugía frente al antígeno recombinante denominado recP29, procedente de protoescolices (Ben Nouir y cols., 2008b, 2009). Desafortunadamente, el 38% de los pacientes objeto de estudio no presentaron anticuerpos frente a este antígeno en ningún momento a lo largo del seguimiento, por lo que su utilidad se limita por su baja sensibilidad.

El antígeno EpC1-GST que mostró un elevado rendimiento para el diagnóstico de la hidatidosis no resultó útil para el seguimiento de pacientes tras cirugía puesto que la sensibilidad obtenida con sueros de pacientes 6 años después de su curación no era diferente a la sensibilidad descrita con pacientes no curados (Li y cols., 2003).

La correlación entre serología y actividad quística, y en relación a ello el seguimiento de pacientes sometidos a tratamiento farmacológico, ha sido estudiada con otros antígenos recombinantes. El antígeno recombinante EgEF-1 $\beta$ / $\delta$  (Margutti y cols., 1999) se propuso como marcador de quistes inactivos, calcificados y en proceso de degeneración, puesto que el nivel de anticuerpos específicos era mayor en pacientes con este tipo de quistes que con quistes activos, aunque su sensibilidad global se mostró relativamente baja (alrededor del 50% cuando se detectan IgGs

específicas). Más tarde, el antígeno Eg19, descrito por Delunardo y cols. (2010), mostró una mayor sensibilidad para los quistes activos que para los inactivos (40 vs. 0%) y además se testó en pacientes tras tratamiento farmacológico, aunque en un número muy limitado (cinco casos), presentando una sensibilidad global del 10%. La proteína recombinante HSP20 también mostró diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad en casos de enfermedad activa e inactiva cuando se utiliza en inmunoblot (81 vs. 24%; Vacirca y cols., 2011).

### *1.5.2.3. INMUNODIAGNÓSTICO: USO DE KITS COMERCIALES*

Hasta el momento varias empresas han desarrollado diferentes formatos para tests de diagnóstico de la hidatidosis que son comercializados. Todos ellos están basados en la detección de anticuerpos en suero mediante el uso de extractos parasitarios crudos, generalmente líquido hidatídico, o fracciones purificadas del mismo. Las sensibilidades y especificidades indicadas por los fabricantes están normalmente por encima del 90%. Sin embargo, no siempre se especifica el número ni las características de los sueros utilizados para la validación del test, por lo que estos valores dados son relativos. Además, algunos de estos kits han sido evaluados posteriormente por diferentes grupos de investigación mostrando en muchas ocasiones valores variables entre distintos autores y distintos a los descritos por la casa comercial. A continuación se muestran algunos ejemplos de test comerciales disponibles.

Dade Behring y Fumouze Diagnostics suministran kits de hemaglutinación indirecta (HAI) para el diagnóstico de hidatidosis. El kit Hydatidose Fumouze® utiliza como antígeno una fracción enriquecida en antígeno 5 de líquido hidatídico. El fabricante señala una sensibilidad del kit del 93% y una especificidad del 94,9% tras el ensayo de 221 sueros humanos, sin mencionar información adicional acerca de los mismos. Los trabajos consultados exhibían una especificidad del test de Fumouze muy similar a la indicada en el kit (Ramzy y cols., 1999; Gonlugur y cols., 2005; Van Doorn y cols., 2007). Ambos tests de HAI fueron evaluados por Auer y cols. (2009), concluyendo que la especificidad del kit de Fumouze era mayor que la del kit Dade Behring. Para el kit Fumouze se han encontrado valores de sensibilidad muy variables



por diferentes autores, desde el 80-88% (Van Doorn y cols., 2007; Liance y cols., 2000) hasta el 56% (Gonlugur y cols., 2005), probablemente dependiendo del panel de sueros que fueron ensayados.

SCIMEDX comercializa un kit de ELISA, Echinococcus Microwell Serum ELISA test, para la detección de anticuerpos frente a antígeno crudo procedente del quiste hidatídico. La sensibilidad indicada de este test es de 97,9% correspondiente a 47 sueros de pacientes con hidatidosis y la especificidad calculada con 12 donantes fue de 91,7%. También se refieren reacciones cruzadas con pacientes con cáncer hepático, absceso hepático y estrongiloidiasis. Organics, formando parte de Inverness Medical, ofrece ImmunoLISA, un ELISA para la detección de IgG en suero frente a líquido hidatídico de oveja. El número de sueros utilizados en la validación del test fue de 329, sin mencionarse los grupos de pacientes a los que corresponden. La sensibilidad y especificidad indicadas son de 97% y 96% respectivamente. Se señala la existencia de reacciones cruzadas con *Leishmania infantum*, *Taenia solium*, *Trichinella spiralis* y *Toxoplasma gondii*, sin descartar posibles reacciones cruzadas con pacientes infectados con otros helmintos y en procesos oncológicos. Para ninguno de estos kits se han encontrado referencias de autores que los hayan ensayado.

ELISA Cyst Hydatid IgG el es el kit creado por Euroimmun Labordiagnostica. El antígeno utilizado es descrito como un extracto procedente de quistes hidatídicos. Con un total de 10 sueros testados la sensibilidad calculada es del 100% y la especificidad referente a 6 sueros es del 100% aunque posteriormente se indica que el 5,1% de 297 donantes estuvieron por encima del valor de corte. No se presentan reacciones cruzadas.

IBL International ha desarrollado un ELISA para la detección de IgG frente a un antígeno de *E. granulosus* no concretado. Según la casa comercial la sensibilidad y especificidad relativas del test en comparación con otro ELISA comercial son superiores al 95%. También se menciona la inexistencia de reacciones cruzadas con *Yersinia*, *Candida* y el virus causante de la parotiditis. La firma Biopharm también cuenta con un test en formato de ELISA, RIDASCREEN® Echinococcus IgG, para la detección de infecciones por el género *Echinococcus*. El kit incluye antígenos purificados sin especificar cuales. La sensibilidad del test es del 100% comparada con la de otros dos ELISAs comerciales y la especificidad con 200 donantes fue también

del 100%. Se describen reacciones cruzadas con infecciones causadas por *T. solium*. Otras compañías, como por ejemplo Vircell, r-Biopharm, Bordier Affinity Products y otros, también comercializan kits de ELISA para el diagnóstico de hidatidosis.

En general, la información publicada acerca de la validez diagnóstica de los kits basados en la técnica de ELISA es limitada, aunque cuando se encuentra, los valores expresados por los fabricantes suelen ser mayores que los encontrados por otros autores. Por ejemplo, para el ELISA de Bordier Affinity Products se da una sensibilidad del 96% por los fabricantes, mientras que otros autores encuentran valores tan alejados como del 40% (Paul y Stefaniak, 2001).

Si nos referimos a tests con mayor sensibilidad y especificidad potencial, como el inmunoblot, también se encuentran algunos kits comerciales basados en esta técnica para el diagnóstico de la hidatidosis. La firma Euroimmun Labordiagnostica tiene en el mercado un kit de inmunoblot llamado *Echinococcus granulosus* Western Blot IgG Kit. Este test fue evaluado por Aslan y cols. (2011). La sensibilidad mostrada por el kit fue del 92% utilizando 25 pacientes y la especificidad fue del 100% con 22 pacientes sanos. LDBIO Diagnostics es otra compañía que ha desarrollado un inmunoblot comercial. El antígeno utilizado es un extracto larvario de *E. multilocularis*. Este es un test indicado para la confirmación de la infección por el género *Echinococcus* que además permite la distinción entre las especies *E. multilocularis* y *E. granulosus* en un 69.4% de los casos. Según Liance y cols. (2000), la sensibilidad para los casos de hidatidosis unilocular en base a 51 sueros testados es de 98% y en los casos de hidatidosis alveolar es de 96,7% para 61 sueros testados. La sensibilidad total para el género *Echinococcus* es de 97,3%. La especificidad obtenida fue del 95% tras el ensayo de 147 sueros de pacientes con diferentes enfermedades parasitarias y autoinmunes que son detalladas por el fabricante, dándose reacciones cruzadas con cisticercosis y una enfermedad autoinmune. En general, los tests basados en el inmunoblot dan lugar a mejores valores diagnósticos, aunque su validación también ha sido escasa.

La inmunofluorescencia indirecta es otra de las técnicas diagnósticas que también han sido adaptadas para su comercialización como en el caso del kit Inmunofluor Hidatidosis, comercializado por Biocientífica SA. Este kit contiene escólices de *E. granulosus* sobre la superficie sobre la que se lleva a cabo la técnica. Su

sensibilidad puede variar entre 60-90% según las características clínicas del paciente. En cuanto a su especificidad se indica que pueden darse reacciones cruzadas con sueros de pacientes con otras enfermedades producidas por helmintos, pacientes con cirrosis y cáncer hepático. Euroimmun Labordiagnostica también cuenta con kits de inmunofluorescencia indirecta para la detección de IgA, IgM e IgG, sin embargo no hemos podido encontrar información adicional acerca de su funcionamiento y composición.

Por último, algunas empresas como Vircell han adaptado la tecnología denominada *lateral flow immunochromatographic assay* (LFIA), más conocida como inmunocromatografía, al diagnóstico de la hidatidosis. El test VIRapid® HYDATIDOSIS detecta anticuerpos específicos totales frente a un antígeno purificado del líquido hidatídico enriquecido en los antígenos 5/B. La prueba tiene una sensibilidad del 94,7% y especificidad de 99,5% obtenidas tras el ensayo de 282 muestras, de las cuales no se especifican detalles. Se testaron además 8 muestras de pacientes con *Leishmania infantum*, *Taenia solium*, *Trichinella spiralis* y *Toxoplasma gondii* siendo todas negativas. Aún así se advierte de la posible presencia de reacciones cruzadas en pacientes infectados con otros helmintos (especialmente cisticercosis) y con pacientes en procesos oncológicos.

En general, el uso de antígenos nativos en todos los kits comerciales encontrados limita su utilidad, debido a la dificultad en la estandarización de reactivos de este tipo, y también a su limitada disponibilidad. Además, y a pesar de que algunos de estos kits parecen ofrecer resultados satisfactorios, parece necesaria una mejor caracterización de los mismos con paneles de sueros más numerosos y mejor caracterizados, tanto para el cálculo de la sensibilidad como de la especificidad, ya que en las ocasiones en las que se encuentran resultados de otros autores, normalmente son peores que los indicados por las propias casas que los manufacturan.

#### 1.5.2.4. DETECCIÓN DE CITOCINAS

Una de las características más destacadas de la hidatidosis humana es la coexistencia de respuestas Th1 y Th2 (Zhang y cols., 2003). El balance de estas

respuestas nos dará indicios de la prognosis. Así, la eliminación o inactivación del quiste hidatídico tras cirugía o tratamiento farmacológico produce una caída drástica de la respuesta Th2, mientras que la respuesta Th1 adquiere entonces especial predominancia (Zhang y McManus, 2006; Zhang y cols., 2012). Se ha propuesto por esta razón que la monitorización de los niveles de citocinas asociadas a cada una de estas respuestas, (TNF $\alpha$ , IL12 o IFN $\gamma$  para Th1, e IL10 o IL4 para Th2), podría mejorar el conocimiento de la prognosis de la enfermedad tras tratamiento quirúrgico o farmacológico (Touil-Boukoffa y cols., 1997; Rigano y cols., 1999; Ortona y cols., 2003).

La detección de citocinas se realiza sobre productos obtenidos *in vitro* de células mononucleadas de sangre periférica extraídas de pacientes, sometidas o no a un estímulo antigénico concreto, usualmente líquido hidatídico, utilizando la técnica de ELISA o detectando los correspondientes ARN mensajeros por RT-PCR de extractos celulares. Utilizando estas técnicas, varios estudios han mostrado que en pacientes con una respuesta favorable al tratamiento con albendazol, se encontraban altos niveles de IFN $\gamma$  y bajos niveles o ausencia de IL10 y IL4 tras un año de tratamiento, mientras que pacientes sin respuesta al tratamiento mostraron altos niveles de IL4 e IL10 asociados con escasa o nula producción de IFN $\gamma$  (Riganò y cols., 1995, 1999; Ortona y cols., 2003).

También se ha intentado correlacionar el nivel de citocinas *ex vivo*, bien mediante ELISA sobre suero o por citometría de flujo con sangre total, aunque en estos casos solamente se encontró una mayor concentración de IL4 en pacientes con quistes tipo CE3b con respecto al resto de quistes (Tamarozzi y cols., 2010; Piccoli y cols., 2012), sin tener una utilidad clara en el seguimiento.

En general, serían necesarios más estudios en los que se incluyera un mayor número de pacientes y también sería recomendable encontrar tests más sencillos de los que actualmente se utilizan para la detección de citocinas, para definir la utilidad de esta aproximación en el seguimiento de pacientes con hidatidosis en la práctica clínica (Ortona y cols., 2003).

### 1.5.3. TÉCNICAS DE DETECCIÓN HISTOLÓGICA DEL PARÁSITO

La presencia de un quiste debido a *E. granulosus* va a poder confirmarse mediante el examen directo de biopsias y de aspirados del fluido quístico.

Las técnicas más sencillas se basan en la observación directa al microscopio de protoscólices y de ganchos rostellares en el aspirado quístico. También la aplicación de técnicas histopatológicas sobre la lámina germinal en la pared del quiste (Devi y Parija, 2003) y técnicas de tinción vital, como la tinción con eosina, nos dará evidencias sobre la naturaleza parasitaria y viabilidad del quiste (Brunetti y cols., 2010).

Otras técnicas más complejas están basadas en la detección de proteínas nativas mediante anticuerpos monoclonales, normalmente dirigidos a los antígenos 5 y B del líquido hidatídico (Siles-Lucas y Gottstein, 2001). También se ha trabajado en técnicas para la detección de ADN parasitario mediante el uso de sondas y la construcción de cebadores específicos para su aplicación en PCR. Estas técnicas están dirigidas normalmente a la identificación de la especie y cepa implicada (Gottstein, 1992), pero también se han utilizado para comprobar la viabilidad quística tras quimioterapia u otros tratamientos (Siles-Lucas y Gottstein, 2001). Otra herramienta para determinar la viabilidad sería el *magnetic-resonance-spectrometry* (MRS) que permite la cuantificación de metabolitos presentes en el líquido hidatídico (Hosch y cols., 2008).

Estas técnicas llevadas a cabo sobre biopsias o aspirados quísticos son de carácter confirmatorio, ya que tienen una sensibilidad del 100%. Sin embargo, serían inviables como técnicas de diagnóstico rutinario debido a que conllevan un proceso invasivo con todo lo que ello implica.



## **2. HIPÓTESIS**

---





## **DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA HIDATIDOSIS, UN PROBLEMA AÚN NO RESUELTO**

En la actualidad, el diagnóstico y seguimiento de la hidatidosis en la práctica clínica está basado la mayor parte de las veces en la identificación de estructuras quísticas por técnicas de imagen, y confirmación del diagnóstico con técnicas serológicas de detección de anticuerpos específicos, generalmente la técnica ELISA utilizando como antígeno el líquido hidatídico, y si ésta resulta dudosa, la técnica de inmunoblot utilizando el mismo antígeno (Eckert y Deplazes, 2004; Moro y Schantz, 2009). La confirmación de la presencia de un quiste hidatídico se realiza mediante el examen del contenido interno del quiste y por estudios histológicos (Brunetti y cols., 2010). En general, esta aproximación permite el diagnóstico de un gran porcentaje de casos de hidatidosis.

Sin embargo, estas técnicas aún tienen una serie de inconvenientes. Tal y como hemos mencionado, las imágenes necesitan ser confirmadas por otras técnicas, especialmente cuando resultan no patognomónicas, y son de utilidad limitada para el seguimiento. Las técnicas de confirmación que se limitan a la demostración de anticuerpos frente al líquido hidatídico presentan serias limitaciones, entre ellas la presencia de un porcentaje de pacientes que a pesar de sufrir la enfermedad resultan negativos, y una serie de reacciones cruzadas en proporción variable, especialmente limitantes a la hora de distinguir pacientes con hidatidosis unilocular de aquellos con hidatidosis alveolar y con cisticercosis. Las limitaciones del uso del líquido hidatídico para el seguimiento son aún mayores, debido a la persistencia de anticuerpos frente a esta mezcla antigénica muchos años después de la curación.

A pesar de estos problemas, no se ha llegado a ninguna otra alternativa antigénica que haya sustituido efectivamente al uso del líquido hidatídico, ni para el serodiagnóstico ni para el seguimiento de pacientes con hidatidosis. La mayor parte de los antígenos alternativos, sean éstos recombinantes o péptidos sintéticos, siguen presentando problemas de sensibilidad, por lo que la definición de candidatos más sensibles sería deseable, y además casi ninguno de estos nuevos candidatos parece tener aplicabilidad para el seguimiento.

Además, se ha realizado generalmente una caracterización parcial y en algunos casos errónea de estos nuevos candidatos. En este sentido, encontramos falta de

repetitividad en los resultados dados por distintos laboratorios, cuando se utilizan los mismos antígenos. Las fuentes de variación pueden ser debidas a cuestiones técnicas (por ejemplo, tipo de isotipo detectado, soporte de detección, estadística aplicada al análisis de los resultados), pero también a factores determinados por la enorme complejidad clínica de la hidatidosis. Se ha mencionado que variables relacionadas con el propio parásito, tales como la localización, tamaño del quiste, número, integridad de la pared del quiste y viabilidad del parásito, así como factores relacionados con el manejo clínico del paciente, como la aplicación de tratamiento, pueden influir en la presencia de un nivel de anticuerpos específicos detectable en suero. Estas mismas variables influirán en la validez de cada antígeno para su uso en el seguimiento de pacientes con hidatidosis. Por tanto, la definición de estas variables resulta imprescindible para la correcta validación de la sensibilidad de nuevas herramientas serodiagnósticas potencialmente aplicables a la hidatidosis.

En cuanto a la especificidad, sería recomendable la definición de verdaderos negativos, el uso de sueros de pacientes con otras patologías con hallazgos clínicos o imágenes similares a las de los pacientes con hidatidosis, y de pacientes con otros parásitos relacionados antigénicamente con *E. granulosus*.

Al mismo tiempo, se ha mencionado que la hidatidosis es un problema importante en muchos países en desarrollo, mucho más acuciante que en países desarrollados. La falta de recursos para el diagnóstico de pacientes en países en desarrollo plantea la necesidad de disponer de métodos diagnósticos y de seguimiento alternativos, con buenas cualidades diagnósticas, fáciles de utilizar y que además resulten en un bajo costo de producción, transporte y manejo.

## **3. OBJETIVOS**

---



En este trabajo se plantea la obtención de nuevos antígenos recombinantes derivados del anteriormente descrito por nosotros, denominado B2t, con el objetivo global de mejorar el rendimiento de producción y el rendimiento diagnóstico obtenido con el mismo. Los nuevos antígenos se ensayarán con paneles de sueros bien caracterizados, para definir lo más detalladamente posible su utilidad en el diagnóstico y el seguimiento de la hidatidosis humana. El mejor candidato se utilizará para el desarrollo de un test de manufactura y uso económico, potencialmente comercializable y útil en países endémicos e hiperendémicos.

Los objetivos concretos son:

1. Obtención de nuevos antígenos recombinantes derivados del antígeno B2t, que aumenten el rendimiento diagnóstico y de producción con respecto al mismo.
2. Comparación preliminar de la sensibilidad y especificidad de los nuevos antígenos recombinantes con el B2t y el líquido hidatídico para el diagnóstico de la hidatidosis.
3. Validación sobre un panel de sueros más extenso de aquel antígeno con mayor rendimiento diagnóstico, en comparación con el B2t y el líquido hidatídico.
4. Definición de las variables clínicas que influyen en el rendimiento diagnóstico de los distintos antígenos ensayados.
5. Comparación del nuevo antígeno con herramientas que actualmente se utilizan rutinariamente en el diagnóstico de la hidatidosis en clínica.
6. Caracterización de la validez del nuevo antígeno para el seguimiento de pacientes con hidatidosis, en comparación con el B2t y con el líquido hidatídico.
7. Diseño y obtención de un kit comercializable para el diagnóstico y seguimiento de la hidatidosis, conteniendo el nuevo antígeno o los

anticuerpos correspondientes, basado en la inmunocromatografía, y comparación de su utilidad con otras herramientas comerciales.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

---





## 4.1. OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS

### 4.1.1. OBTENCIÓN DEL LÍQUIDO HIDATÍDICO

El líquido hidatídico (LH) se obtuvo a partir de quistes hidatídicos de ovejas procedentes de diversos mataderos de Logroño, que contenían protoescolices viables (donación del Dr. Santos; Consejería de Salud de La Rioja), por punción en campana de flujo de los quistes con jeringas de 10 ml. El LH recibido en el laboratorio se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 minutos para eliminar las partículas sólidas (arenas hidatídicas) que se guardaron a -80°C para su uso posterior. El sobrenadante se liofilizó y una parte se almacenó a -80°C hasta su uso. Otra parte se resuspendió en agua destilada estéril y se determinó la concentración de proteínas con el kit MicroBCA Protein Assay (Pierce). Después fue almacenado a -20°C hasta su uso.

### 4.1.2. OBTENCIÓN DE LOS CLONES RECOMBINANTES

#### 4.1.2.1. OBTENCIÓN DEL CLON RECOMBINANTE B2t

El antígeno B2t en forma de recombinante se obtuvo en un trabajo anterior realizado por nuestro equipo (Hernández-González y cols., 2008). Brevemente, se extrajo el ARN total de *E. granulosus* a partir de arenas hidatídicas con el kit RNeasy Protect Mini (Qiagen), y a continuación se realizó una transcripción inversa del ARN total con el kit First-Strand cDNA Synthesis (Roche Farma). El ADN complementario resultante se utilizó para realizar una PCR con la pareja de cebadores B2tFwd (5'-AAAGATGAGCCAAAAGCAC) y B2tRev (5'-AGGCAAATCATGTGTCCCG), basada en la secuencia de nucleótidos del antígeno B2 correspondiente al genotipo G1 (aislado ovino) disponible en GenBank (número de acceso U15001). Estos cebadores fueron diseñados para amplificar la secuencia codificante de la porción carboxi-terminal del antígeno B2 (los últimos 70 aminoácidos del total de la secuencia) con el fin de eliminar la región codificante de un péptido señal presente en la secuencia (figura 8). La predicción del péptido señal fue hecha mediante la aplicación SIG-Pred ([www.bioinformatics.leeds.ac.uk/prot\\_analysis/Signal.html](http://www.bioinformatics.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.html)). La PCR se realizó en 30 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 48°C y 1 minuto a 72°C, esperándose obtener un producto de 241 pares de bases.

A

```

1 GTGTGTATCTGCGTGTGACATTTGTGGAGACAATCGCATAATGAGGACTT 50
51 ACATCCTTCTCTCTCTTTGCTCTCGTGGCTTTTCGTGGCCGTCTGTTCAAGCT 100
101 AAAGATGAGCCAAAAGCACACATGGGGCAAGTGGTAAAAAAGATGGGG 150
151 TGAACCTTCGAGACTTCTTTAGAAATGATCCACTGGGTCAAAGACTTGTCTG 200
201 CTCTTGGCAATGACCTAACTGCCATTTGCCAGAAGCTGCAATTGAAGATT 250
251 CGTGAGGTGCTGAAGAAGTATGTTAAGAATTTGGTGGAAAGAAAAAGATGA 300
301 TGATTCAAAGTAAAGTCATGCGTGGGACACATGATTTGCCTAATAAATTC 350
351 TACTTACCATCCCAT 365

```

B

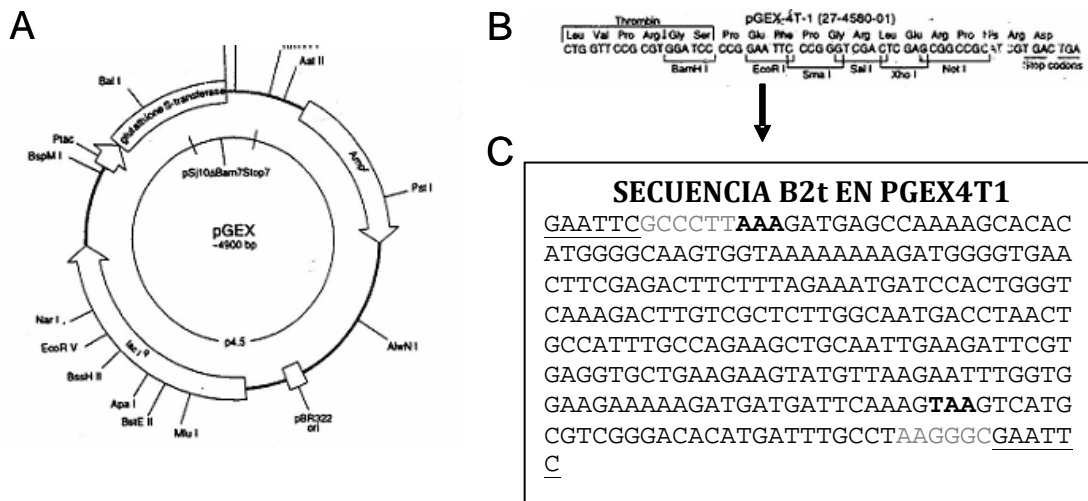
```

1 KDEPKAHMGQVVKRWGELRDFFRNDPLGQRLVALGNDLTAICQKLQLKI 50
51 REVLKKYVKNLVEEKDDDSK 70

```

**Figura 8.** Secuencias correspondientes al antígeno B2 (nucleotídica) y al B2t (peptídica). A. Secuencia nucleotídica del antígeno B2, genotipo G1 (aislado ovino) disponible en GenBank (U15001). En ella se señalan los codones de inicio (ATG) y de terminación (TAA) en gris, y subrayadas las bases correspondientes a los cebadores específicos utilizados en la PCR para amplificar la secuencia codificante de la proteína recombinante B2t. La porción de secuencia que codifica el péptido señal aparece en negrita. B. Secuencia aminoacídica de la proteína recombinante B2t.

El producto de la amplificación fue visualizado en un transiluminador ultravioleta tras electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La banda correspondiente se cortó y se purificó con el kit StrataPrep DNA Gel Extraction Kit (Stratagene). El fragmento purificado se clonó en el vector pCR 2.1 TOPO (Invitrogen), y la reacción de clonación fue utilizada para transformar células *Escherichia coli* DH5 (Invitrogen). Los plásmidos fueron posteriormente extraídos de los transformantes seleccionados con el kit StrataPrep Plasmid Miniprep (Stratagene) y digeridos con la enzima de restricción *EcoRI* (Roche Farma). Tras electroforesis y purificación, el producto menor liberado por la digestión fue subclonado en el vector de expresión pGEX-4T1 (GE Healthcare Lifesciences) mediante una reacción de ligación con T4 DNA ligasa (Roche Farma). Los plásmidos fueron nuevamente extraídos para ser secuenciados y comprobar el marco de lectura de la secuencia en el vector.



**Figura 9.** Clonación de la secuencia B2t en el vector de expresión pGEX-4T1. A. Esquema del vector pGEX. B. Sitios de restricción disponibles para la subclonación de secuencias en el vector. C. Secuencia B2t integrada en el vector pGEX-4T1 tras el sitio de restricción *EcoRI*. Se señalan en gris los pares de bases que proceden del vector TOPO y subrayados los sitios de corte para *EcoRI*. Aparecen en negrita el primer codón de la secuencia B2t y el codón de terminación de la misma.

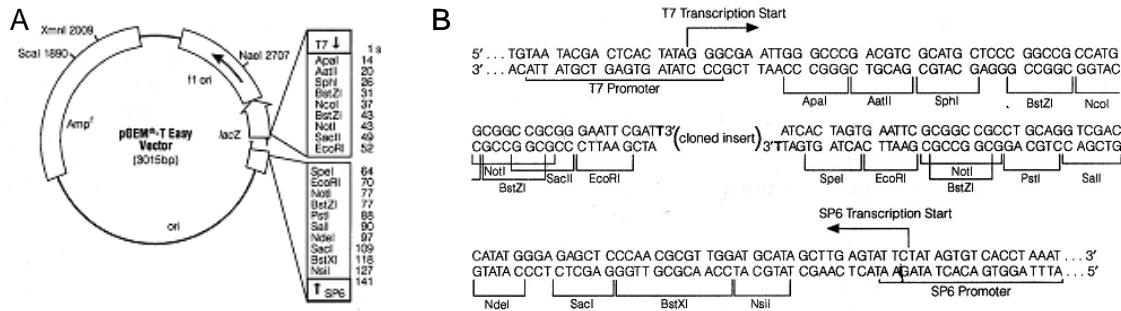
#### 4.1.2.2. OBTENCIÓN DE CLONES RECOMBINANTES DERIVADOS DE LA SECUENCIA B2t.

Para la construcción de clones que contuviesen la secuencia B2t repetida un determinado número de veces en tándem (2B2t, 4B2t y 8B2t), se siguió la estrategia desarrollada por Lennick y cols. (1987), con algunas modificaciones.

Se partió de la secuencia del antígeno B2t en pGEX-4T1 (figura 9C). Se diseñaron cebadores específicos sobre esta secuencia excluyendo el codón de terminación TAA y añadiendo a los extremos 5' sitios de restricción para la enzima *Bgl*III en el cebador *forward* y *Bam*HI en el cebador *reverso*, que aparecen subrayadas en sus correspondientes secuencias: FWDB2tan, 5'- ACAGATCTAAAGATGAG CAAAAGC y REVB2tan, 5'-ATGGATCCCTTTGAATCATCATC.

La PCR se realizó en 35 ciclos, los 5 primeros de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 48°C y 1 minuto a 72°C. En los siguientes 30 ciclos la temperatura de anillamiento fue de 58°C. El producto amplificado fue purificado tras electroforesis y subclonado en el vector pGEM-T-EASY (Promega; figura 10). Los plásmidos resultantes

de la reacción de ligación se utilizaron para transformar células *E. coli* de la cepa XL1B. Los clones recombinantes se seleccionaron con ampicilina y fueron secuenciados para verificar la inclusión del producto de PCR.

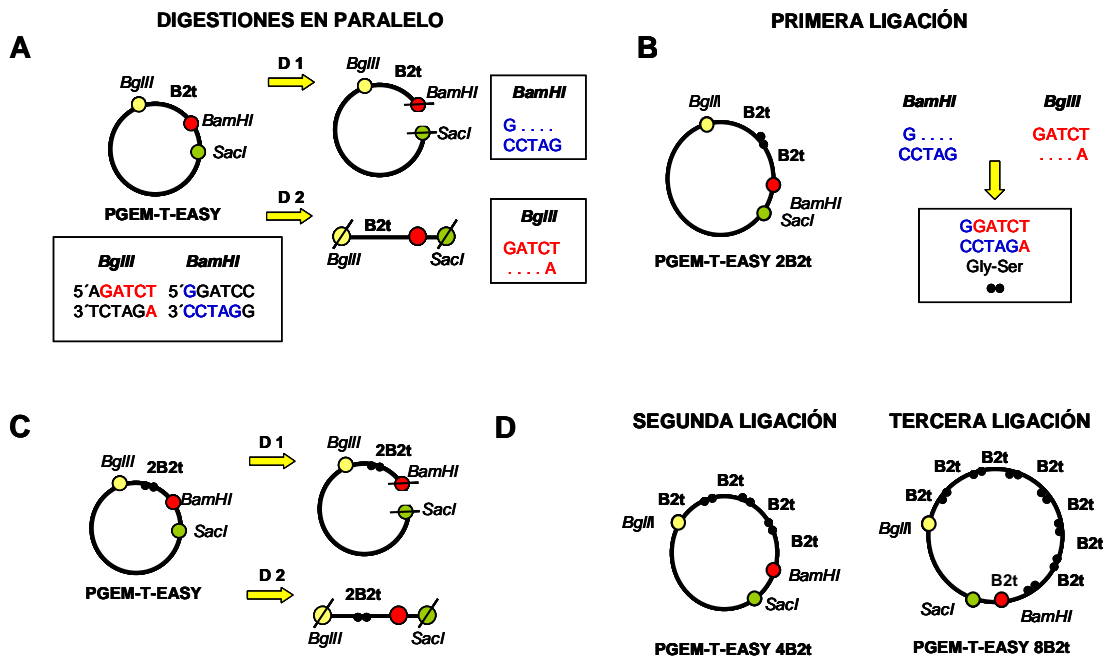


**Figura 10.** Plásmido pGEM-T-EASY. Se muestra la estructura del plásmido (A) y su sitio de clonación (B).

Los plásmidos fueron extraídos de los clones elegidos y se sometieron a dos digestiones diferentes llevadas a cabo en paralelo. En una de ellas, el plásmido pGEM-B2t fue digerido con las enzimas *Bam*HI y *Sac*I, y en la otra, con las enzimas *Bgl*II y *Sac*I. Los productos de digestión (vector pGEM-B2t y secuencia B2t) fueron purificados desde un gel de agarosa. Ambos productos digeridos fueron ligados, de modo que el extremo 5' del fragmento B2t digerido por *Bgl*II se unió al extremo 3' del plásmido pGEM-B2t digerido por *Bam*HI. La correcta unión de las secuencias específicas de corte *Bam*HI-*Bgl*II provocó la pérdida de ambos sitios de restricción en la interfase, quedando 6 pares de bases entre las dos secuencias B2t clonadas en tándem, repetición que quedó flanqueada por sitios de corte *Bgl*II y *Bam*HI.

Sobre los plásmidos seleccionados que contuvieron la secuencia en tándem 2B2t, se repitieron las digestiones anteriormente explicadas, obteniéndose como producto de las mismas el plásmido pGEM-B2t-B2t digerido con *Bam*HI y *Sac*I y un fragmento B2t-B2t digerido en un extremo por la enzima *Bgl*II y en el otro por *Sac*I. Tras la ligación de ambos productos de digestión se obtuvo un plásmido pGEM con 4 copias en tándem de la secuencia B2t.

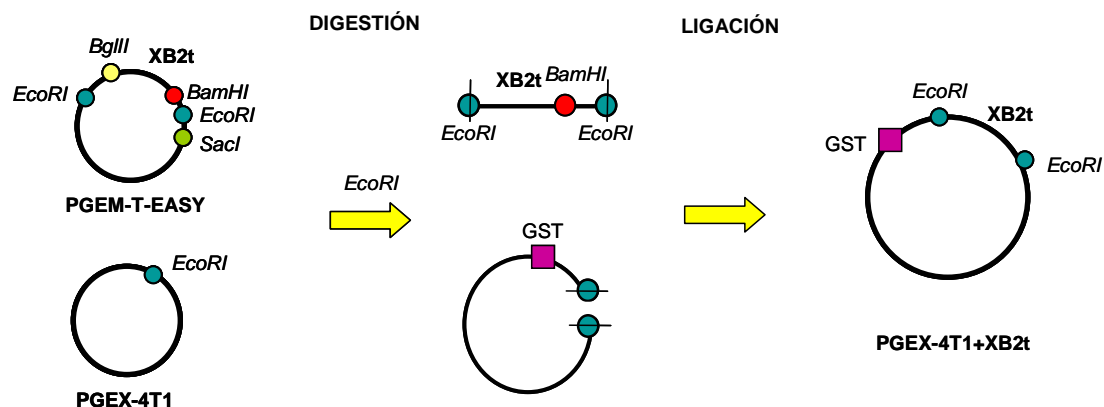
Siguiendo la misma metodología se obtuvo un tercer plásmido con 8 copias de la secuencia B2t. Las clonaciones sucesivas se muestran en la figura 11.



**Figura 11.** Esquema de las clonaciones repetidas en tándem de la secuencia B2t. A. Digestiones en paralelo del plásmido pGEM con una unidad B2t, mostrándose los extremos cohesivos que quedan tras la digestión llevada a cabo por las enzimas *Bgl*III y *Bam*HI. B. Ligación que da lugar a dos secuencias B2t unidas por 6 pares de bases resultado de la unión de los sitios de restricción *Bam*HI y *Bgl*III conllevando la desaparición de los mismos. C. Segundo ciclo de digestiones sobre el plásmido pGEM con 2 copias B2t. D. Ligaciones que dan lugar a 4 y 8 copias secuenciales de B2t con 6 pares de bases separando una de otra.

Después de cada una de las ligaciones que se realizaron para la obtención de las diferentes secuencias en tándem, los plásmidos resultantes fueron utilizados para transformar células *E. coli* XL1B. De las colonias recombinantes seleccionadas en presencia de antibiótico se extrajeron los plásmidos que fueron sometidos a una digestión con *Eco*RI y cargados en un gel de agarosa para comprobar el tamaño de las bandas. Posteriormente, los plásmidos recombinantes fueron secuenciados.

Tras comprobar los resultados de la secuenciación, las secuencias en tándem B2t se subclonaron en el vector de expresión pGEX-4T1 mediante previa digestión con la enzima *Eco*RI tanto del vector de expresión como del vector pGEM que contenía el tándem (figura 12).



**Figura 12** Subclonación de los tándems B2t en el vector de expresión pGEX-4T1 en el sitio de restricción *Eco*RI.

#### 4.1.2.3. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Las secuencias subclonadas en pGEX se expresarán como proteínas de fusión en la cepa de *E. coli* BL21 CodonPlus-RIL (Stratagene) incluyendo en su extremo N-terminal la proteína GST como *tag* o etiqueta. Este *tag* nos permitirá purificar la proteína del resto del material citosólico de la bacteria mediante la unión específica de la GST a la resina Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare). La obtención de la proteína de interés purificada se hará mediante el corte específico de la enzima trombina que se encuentra entre el final de la GST y el inicio de la proteína específica.

El protocolo que se llevó a cabo para la expresión y purificación de la proteína recombinante B2t (Hernández-González y cols., 2008) se aplicó al resto de antígenos recombinantes 2B2t, 4B2t y 8B2t, y se detalla a continuación.

1.-Preinocular una alícuota de la bacteria recombinante en un erlenmeyer con medio 2xYT (para 1 litro: triptona-16 g, extracto de levadura-10 g, NaCl-5 g, pH 7) estéril, con ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (50µg/ml).

2.-Incubar toda la noche a 37°C en agitación a 160 rpm.

3.-Diluir el preinóculo 100 veces en medio 2xYT con ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (50 µg/ml). El volumen ocupado por el medio no debe sobrepasar el 10% del volumen total del recipiente que lo contiene para una adecuada aireación.

Incubar a 37°C en agitación hasta conseguir una densidad óptica entre 0,8-1 a una longitud de onda de 595 nm (~3 horas).

4.-Añadir isopropil-tiogalactósido (IPTG, Ambion) a una concentración final de 0,1 mM. Inducir la expresión de la proteína de fusión durante 3 horas en las mismas condiciones de temperatura y agitación.

5.-Centrifugar el medio a 9.000 rpm durante 10 minutos.

6.-Resuspender el sedimento en PBS 1X a 4°C, en 1:100 del volumen original de cultivo.

7.-Lisar las células por sonicación mediante 5 ciclos de 40 segundos a una potencia del 80% (sonicador VibraCells, Sonics Materials), en hielo.

8.-Añadir Triton X-100 a una concentración final del 1%. Mantener en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

9.-Centrifugar la muestra a 20.000 rpm durante 30 minutos a 4°C.

10.-Añadir el sobrenadante obtenido del paso anterior a la resina utilizando aproximadamente 1 ml de resina Glutathione Sepharose 4B equilibrada (GE Healthcare) por litro de medio de cultivo. A continuación mantener en agitación durante 30 minutos.

11.-Centrifugar 5 minutos a 3.000 rpm a 4°C y eliminar el sobrenadante. Reservar una pequeña alícuota para analizar en un gel de acrilamida. Realizar al menos tres lavados de la resina con PBS 1X en una proporción 50:1 al volumen de resina.

12.-Añadir 50 unidades de trombina por mililitro de resina junto con 500 µl de PBS 1X.

13.-Dejar en agitación a temperatura ambiente durante al menos 16 horas.

14.-Separar el sobrenadante de la resina por centrifugación durante 5 minutos a 3.000 rpm a 4°C, cogiendo una pequeña alícuota del sobrenadante y otra de la resina para analizarlas en un gel de acrilamida.

15.-Calcular la concentración de proteína obtenida mediante la técnica colorimétrica BCA (Pierce).

El rendimiento de obtención de cada una de las proteínas se comparó con el de la recombinante B2t en las mismas condiciones, como se explica a continuación. Se recogió por centrifugación a 9.000 rpm durante 10 minutos el pellet celular de cada uno de los clones tras la inducción de 1 l de cultivo de cada uno de ellos. Los pellets resultantes se pesaron y posteriormente se resuspendieron en el mismo volumen (10 ml de PBS) para todos los clones. Los pellets fueron lisados tal y como se detalla en el protocolo anterior, y las proteínas que quedaron en el sobrenadante tras centrifugación se purificaron con el mismo volumen de resina de afinidad. Tras el corte con trombina, se cargó un volumen igual para todas las proteínas (20 µl de muestra más 5 µl del tampón de carga con SDS y mercaptoetanol -Sambrook y Russell (2001)- tras hervirlas durante 5 minutos a baño María), en un gel de acrilamida al 12%, preparado según el protocolo de Sambrook y Russell (2001). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (Sambrook y Russell, 2001), y se estimó la integridad y la abundancia relativa de cada proteína, comparando estos resultados con los obtenidos mediante la valoración de las mismas proteínas con el kit BCA (Pierce).

## **4.2. CARACTERIZACIÓN DIAGNÓSTICA DE LOS NUEVOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES EN ELISA**

### **4.2.1. PRIMERA SELECCIÓN DE ANTÍGENOS EN ELISA**

Tras la expresión y purificación de los nuevos antígenos recombinantes 2B2t y 4B2t, estos fueron testados en ELISA para determinar su validez diagnóstica de acuerdo a su sensibilidad y especificidad comparada con la del recombinante B2t original y el líquido hidatídico (LH), que se eligió como *gold standard*. El antígeno 8B2t no se testó por su bajo rendimiento de producción (ver resultados).

Para esta primera selección se utilizaron 102 sueros, incluyendo 49 sueros de donantes sanos y 54 sueros de pacientes con hidatidosis hepática confirmada por cirugía, procedentes de hospitales españoles. Estos últimos se eligieron en base a su reactividad frente al antígeno recombinante B2t en ELISA (12 negativos y 42 positivos).



El ELISA indirecto para la detección de IgG total en el suero de pacientes, fue la técnica de elección para la comparación del rendimiento diagnóstico de los diferentes recombinantes entre sí y con el LH. Tras la puesta a punto de las condiciones óptimas, el protocolo definitivo constó de 6 pasos que se detallan a continuación.

1.-Tapizado. Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos (Corning, Spain) de fondo plano. En cada pocillo de la placa se dispensaron 100 µl de tampón carbonato pH 9,6 (para 1 litro: NaHCO<sub>3</sub> (Panreac)-2,93 g, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Panreac)-1,59 g) con el antígeno a una concentración de 5 µg/ml en el caso del LH y 0,5 µg/ml en el caso de las proteínas recombinantes B2t, 2B2t y 4B2t. Las placas fueron incubadas toda la noche (12-18 horas) a 4°C. Al día siguiente se retiró la solución de los pocillos y se hicieron 6 ciclos de lavado cada uno de 300 µl/pocillo con PBS-Tween 0,05% en el lavador WellWash 4 MK 2 (Thermo Scientific).

2.-Bloqueo. A cada pocillo se aplicaron 200 µl de una solución de bloqueo que contenía 1% de BSA (Sigma) en PBS-Tween 0,05%. Se incubó 1h 30 minutos a 37°C.

3.-Sueros. Cada uno de los sueros se diluyó en la solución de bloqueo a razón de 1:200 y se dispensaron 100 µl por duplicado en la placa, tras retirar la solución de bloqueo. La placa se incubó 1 hora a 37°C y después fue lavada 6 veces tal y como se ha detallado en el primer paso.

4.-Anticuerpo secundario. Para la detección de IgG se utilizó una inmunoglobulina anti-IgG total humana conjugada con peroxidasa producida en conejo (A8792, Sigma). La anti-IgG se diluyó en solución de bloqueo a 1:2.000, y se aplicaron 100 µl por pocillo. Se incubó 1 hora a 37°C. Después se realizaron 6 lavados como en el apartado anterior.

5.-Revelado de la reacción. En cada pocillo se dispensaron 100 µl de la solución de revelado preparada con 10 ml de tampón citrato pH 5 (para 1 litro: C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>\*H<sub>2</sub>O (Panreac)-4,48 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Panreac)-37,08 g), 2,8 mg de orto-fenileno diamina (OPD, Sigma) y 4µl de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Panreac). Se incubó en oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 3 N (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Panreac).

6.-Lectura. La absorbancia de cada pocillo fue leída a 492 nm en lector de ELISA (SLT-Lab Instruments, EAR 400 FT).

Los valores de densidad óptica obtenidos en ELISA para cada suero fueron transformados en el denominado índice serológico (IS). Este valor se calcula para poder normalizar y comparar directamente las distintas placas de ELISA, comparación más complicada de realizar si se hace atendiendo a las densidades ópticas. El IS nos permite calcular un valor de corte común para todos los ELISAs desarrollados para cada antígeno. Este índice se calculó aplicando la siguiente fórmula:  $[(CN-S)/(CN-CP)]*100$ , donde CN y CP representan el valor de densidad óptica obtenido con el control negativo y positivo respectivamente, y S es el valor obtenido para cada suero a testar.

#### 4.2.2. COMPARACIÓN DE LOS ANTIGENOS 2B2t, B2t Y LH EN ELISA Y UN KIT COMERCIAL DE HAI. INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La selección inicial indicó que el antígeno 2B2t podría constituir una buena alternativa diagnóstica con respecto al antígeno B2t. Por eso, el antígeno 2B2t se comparó en ELISA con el antígeno original (B2t), el líquido hidatídico (el más frecuentemente utilizado en serodiagnóstico de pacientes con hidatidosis) y con una técnica comercial de uso rutinario en hospitales (test de hemaglutinación indirecta – HAI- de Fumouze Diagnostics, Francia -Hydatidose Fumouze-), utilizando un panel de sueros de pacientes con hidatidosis mayor que el empleado en la selección inicial.

El kit Hydatidose Fumouze está basado en la detección de anticuerpos específicos en suero contra una fracción purificada del antígeno 5 de *E. granulosus*. Los valores de sensibilidad y especificidad dados por la casa comercial son de 94,4% y 93%, respectivamente. Este kit se utilizó siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Brevemente, los sueros fueron diluidos a 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 y 1:640 en la solución salina del kit. Después se añadió una gota de eritrocitos sensibilizados a cada pocillo y las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por 2 horas. A continuación, las reacciones de aglutinación fueron interpretadas siguiendo las

instrucciones del kit. Los sueros fueron considerados positivos cuando se observó aglutinación en las diluciones iguales o superiores a 1:320 (valor de corte). El control de aglutininas se desarrolló para algunos de los sueros tomados al azar.

El test de ELISA para el LH y los antígenos recombinantes B2t y 2B2t se realizó tal y como se ha detallado en el apartado anterior.

Para el cálculo y la comparación de la sensibilidad de cada test se utilizó un panel que constó de 186 sueros de pacientes procedentes de Perú con hidatidosis confirmada mediante cirugía o imagen de los que se disponía de los datos clínicos detallados en la tabla 8.

Para determinar la especificidad y las reacciones cruzadas de cada uno de los antígenos y de la técnica HAI se utilizaron 110 sueros de individuos sanos y 36 sueros de pacientes con hepatitis (15 con hepatitis B y 21 con hepatitis C) recogidos en el Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Además se incluyeron 138 sueros de pacientes con parásitos relacionados con *E. granulosus*. De estos, 70 sueros eran de pacientes con neurocisticercosis (57 de pacientes peruanos y 13 de pacientes mejicanos), 57 sueros de pacientes con hidatidosis alveolar procedentes de Suiza y 11 pacientes de Perú con teniosis. Todos ellos fueron confirmados por microscopía o por serología específica en inmunoblot y ELISA.

El mejor valor de corte fue determinado para cada uno de los antígenos mediante curvas ROC, elaboradas con los valores de IS para cada suero (ver más arriba), incluyendo como verdaderos positivos los sueros de pacientes con hidatidosis, y como verdaderos negativos, los sueros de donantes sanos y los de aquellos pacientes con otras patologías. Para este cálculo, se utilizó el programa SPSS *version 19.0*. El valor de corte del kit de hemaglutinación fue el determinado por la casa comercial.

Con ambos grupos de sueros además se calculó y comparó la eficiencia diagnóstica total de cada test también mediante curvas ROC. Estas curvas representan en un gráfico los valores de sensibilidad (eje Y) y 1-especificidad (eje X) que toma el test con respecto a cada posible valor de corte, por lo que el cálculo del área bajo la curva (ABC) es un valor que nos permite comparar la utilidad total de cada test: cuanto mayor sea, mayor será la utilidad. Las diferencias significativas

entre los valores de ABC fueron determinadas mediante la prueba de “homogeneidad de áreas”. Para este cálculo se utilizó el programa Epidat 4.0 ([http://www.sergas.es/MostrarContidos\\_N3\\_T01.aspx?IdPaxina=62713](http://www.sergas.es/MostrarContidos_N3_T01.aspx?IdPaxina=62713)).

Tras determinar la sensibilidad, especificidad y eficiencia diagnóstica de cada uno de los tests, se estudiaron los factores que podrían estar afectando a la sensibilidad de nuestros antígenos y al test comercial de HAI. Para ello los sueros de hidatidosis procedentes de Perú fueron agrupados según las características clínicas disponibles, calculándose la sensibilidad con cada uno de los tests para cada una de las opciones. Las diferencias entre los distintos grupos en cuanto a la sensibilidad mostrada se evaluaron estadísticamente mediante el test chi-cuadrado. Mediante un análisis de regresión logística binaria bivariante se calcularon los valores de odds ratio (OR) para cada característica clínica, y con un análisis de regresión logística binaria multivariante se analizaron en conjunto aquellas que mostraron ser las más influyentes en el resultado de los tests de inmunodiagnóstico, para discernir cuáles son los factores que combinadamente y de forma más directa afectan a cada test diagnóstico.

Algunos de los grupos que fueron comparados presentaron un número muy limitado de sueros, lo que hizo necesario el ensayo con un panel de sueros más amplio. Este nuevo panel contó con un total de 942 sueros de pacientes de Italia y de Alemania, con hidatidosis confirmada por cirugía o por imagen. Estos sueros se agruparon con los de Perú para los análisis posteriores, según sus variables clínicas, tal y como se muestra en la tabla 9.

Los análisis estadísticos aplicados a este grupo de sueros fueron los mismos que los utilizados para el panel de sueros de Perú.

Todos los cálculos estadísticos se hicieron con el programa SPSS *version* 19.0.

**Tabla 8.** Descripción de los pacientes con hidatidosis de Perú

	<b>Número</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Hidatidosis confirmada por</b>		
Cirugía	134	72,0
Imagen	52	28,0
<b>Género</b>		
Hombres	85	45,7
Mujeres	101	54,3
<b>Número de quistes</b>		
Único	108	58,1
Múltiple	78	41,9
<b>Localización quística</b>		
Hígado	65	34,9
Pulmón	86	46,2
Hígado y pulmón	24	12,9
Otras	11	6
<b>Clasificación quística*</b>		
CE1	44	57,9
CE2	22	28,9
CE3	8	10,5
CE4	2	2,6
ND	13	
<b>Complicaciones</b>		
No	87	46,8
Sí	98	52,7
ND	1	0,5
<b>Antecedentes</b>		
No	166	89,2
Sí	20	10,8
<b>Toma del suero</b>		
Antes del tratamiento	129	69,4
Después del tratamiento	57	30,6

\* Solo para los casos de quistes en el hígado de acuerdo con la clasificación de la OMS (2003). Complicaciones: quistes rotos en 51 pacientes y quistes infectados en 47 pacientes. Antecedentes, indica si el paciente presentó la enfermedad en el pasado. De los 57 pacientes de los que se colectó el suero después de tratamiento, 55 habían sido tratados quirúrgicamente, y 2 habían sido tratados exclusivamente con albendazol. ND, no determinado. Número, indica el número de sueros correspondiente a cada categoría. Porcentaje, indica el porcentaje de sueros dentro de cada categoría con respecto al total.

**Tabla 9.** Descriptiva de los sueros incluidos en cada variable clínica, procedentes de pacientes de Italia, Alemania y Perú.

	<b>Número</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Localización quística</b>		
Hígado	942	83,5
Otras	162	14,4
ND	24	2,1
<b>Número de quistes</b>		
Único	662	58,7
Múltiple	464	41,1
ND	2	0,2
<b>Clasificación quística</b>		
CE1	119	10,5
CE2	81	7,2
CE3a	105	9,3
CE3b	325	28,8
CE4	266	23,6
CE5	134	11,9
ND	98	8,7
<b>Toma del suero</b>		
Antes del tratamiento	661	58,6
Después del tratamiento	458	40,6
ND	9	0,8

En localización quística, “Otras” incluye pulmón, músculo, riñón, corazón, colon, bazo, peritoneo y espina dorsal. Momento de la toma del suero: “Después del tratamiento” se refiere a aquellos sueros recogidos de pacientes que fueron sometidos a un tratamiento, siempre y cuando no hayan transcurrido más de dos años después del mismo. De los 458 sueros colectados después del tratamiento, 121 correspondían a pacientes tratados quirúrgicamente junto con albendazol, 69 a pacientes sometidos solo a cirugía y 268 a pacientes que habían sido tratados exclusivamente con albendazol. ND, no determinado. Número, indica el número de sueros dentro de cada categoría. Porcentaje, indica el porcentaje dentro de cada categoría con respecto al total.

### **4.3. CARACTERIZACIÓN DEL ANTÍGENO 2B2t EN COMPARACIÓN CON B2t Y LH, PARA EL SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON HIDATIDOSIS**

En este ensayo se utilizaron un total de 634 sueros de 231 pacientes con hidatidosis procedentes de Italia, Alemania y España, incluyendo los de esta última procedencia un total de 71 sueros de 35 pacientes en seguimiento tras cirugía (Hernández-González y cols., 2008). En la tabla 10 se detallan sus características clínicas. Todos ellos fueron seguidos por imagen durante todo el período de seguimiento. Este período, al tratarse de una colecta retrospectiva, fue variable para cada paciente.

Los 231 pacientes se dividieron según su manejo clínico en tres grupos: sometidos a tratamiento quirúrgico o a una técnica de aspiración, sometidos a tratamiento exclusivamente farmacológico, y solamente observados (*watch and wait*). En todos los casos, nuestro objetivo fue determinar en qué medida existía concordancia entre la presencia y/o el estado del quiste (activo, transicional o inactivo), evaluado por técnicas de imagen (*gold standard*) y el nivel de anticuerpos específicos, y por tanto entre la evolución del paciente y el resultado de la serología para cada test.

En este sentido, los pacientes que habían sido sometidos a una intervención quirúrgica (n=57) o a una técnica de aspiración (n=14), fueron divididos en “pacientes curados”, considerados como aquellos que mostraban la ausencia del quiste extraído por cirugía o la cavidad residual tras la aspiración, sin presentar recurrencias o reaparición de imágenes sugerentes de actividad parasitaria durante el tiempo que duró el seguimiento. El segundo grupo fueron “pacientes no curados”, incluyendo en esta categoría pacientes en los que se detectó por imagen hidatidosis secundaria o hidatidosis primaria no detectada anteriormente, o aquellos que habiendo sido sometidos a una técnica de aspiración, mostraron imágenes sugerentes de actividad parasitaria en la correspondiente cavidad residual, durante el período de seguimiento. Todos los pacientes incluidos en este grupo disponían al menos de dos sueros, siendo el primero de ellos positivo a todos los antígenos en ELISA y recogido antes o poco después de la intervención.

En el estudio de estos pacientes en seguimiento, se comprobó si los valores de IS de pacientes curados y no curados seguían una distribución normal para los distintos intervalos de tiempo, mediante la representación de dichos valores en diagramas box-plot y la prueba de Kolmogórov-Smirnov, para poder determinar así cual era el test estadístico que se debía aplicar para la comparación de esos datos. Se determinó que el test de Kruskal-Wallis era el indicado, utilizándose dicho test para comprobar la existencia de diferencias entre los distintos intervalos de tiempo dentro de cada grupo, considerándose valores significativos cuando  $P < 0,05$ . Este test nos indicará si existen diferencias estadísticamente significativas en las variaciones de IS (nivel de anticuerpos específicos) dentro de cada uno de esos dos grupos a lo largo del tiempo de seguimiento.

En pacientes tratados exclusivamente con albendazol, y en aquellos sometidos a observación sin tratamiento, se tuvo en cuenta la clasificación quística antes del tratamiento y durante el período de seguimiento. Los pacientes con tratamiento farmacológico se agruparon en sujetos con buena evolución, cuando la imagen evolucionaba a estados inactivos (CE4 y CE5; 7 pacientes, 30 sueros), y con mala evolución cuando la imagen no evolucionaba a estados inactivos (37 pacientes, 148 sueros). En estos dos grupos, se realizó una comparación de los ISs frente a cada uno de los antígenos testados, a lo largo del tiempo tras tratamiento, comenzando a contar los intervalos de tiempo desde la finalización del último ciclo de tratamiento, y clasificando el resto de los sueros anteriores como tiempo 0. El primer suero recogido de cada paciente tenía un valor positivo en ELISA para todos los antígenos.

Al igual que se hizo con el grupo de pacientes en seguimiento tras una cirugía o técnica de aspiración, el test estadístico aplicado para la determinación de diferencias significativas entre los diferentes intervalos de tiempo aquí, fue el de Kruskal-Wallis tras comprobar que los datos no seguían una distribución normal.

Además, tanto para el seguimiento de pacientes tras cirugía/aspiración como para los tratados farmacológicamente se calculó el porcentaje de positividad para cada uno de los subgrupos de sueros de pacientes en cada intervalo de tiempo.

En el caso de los pacientes en *watch and wait*, se realizó una clasificación también en cuanto al tipo de quiste, con 116 pacientes (236 sueros, que fueron



recogidos desde el inicio, sin tener en cuenta si eran o no positivos en ELISA). Sin embargo, y por razones obvias, la mayor parte de estos pacientes ya presentaba al inicio del seguimiento una imagen inactiva (CE4 o CE5). Además, en este grupo, solo dos de los pacientes tienen una evolución desde una lesión activa a una inactiva durante el período de seguimiento.

Para comparar la distribución de los valores de IS en los sueros agrupados por tipo de quiste en los pacientes *watch and wait* (CE1, CE2, CE3a, CE3b, CE4 y CE5), estos fueron representados en diagramas box-plot y se sometieron a la prueba de Kruskal-Wallis para la determinación de diferencias significativas entre dichos grupos y a la prueba de U de Mann-Whitney buscar diferencias entre quistes activos y transicionales (CE1 a CE3) y quistes inactivos (CE4 y CE5).

Además, se calculó el porcentaje de positividad para cada uno de los subgrupos de sueros de pacientes *watch and wait*. Este porcentaje y su tendencia con respecto a la actividad quística se comparó con 264 sueros de pacientes que habían sido sometidos a tratamiento farmacológico, y que fueron seleccionados del correspondiente archivo SPSS con las siguientes características: pacientes tratados solo con fármacos y cuyos sueros no tengan una fecha posterior a los dos años tras la finalización del último ciclo de tratamiento. Todos los cálculos estadísticos se hicieron con el programa SPSS *version 19.0*.

**Tabla 10.** Número de pacientes y sueros seleccionados para la evaluación de la serología en el seguimiento de pacientes según el tipo de tratamiento.

SEG. TRAS CIRUGÍA O ASPIRACIÓN	Pacientes	Sueros	Tiempo tras tratamiento				
			0	1	2	3	>3
<b>TOTAL</b>	71	220	0	1	2	3	>3
<b>Curados</b>	60	176	54	67	19	13	23
<b>No curados</b>	11	44	5	11	6	5	17

SEG. TRAS TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO	Pacientes	Sueros	Tiempo tras tratamiento				
			0	1	2	3	>3
<b>TOTAL</b>	44	178	0	1	2	3	>3
<b>Buena evolución</b>	7	30	9	7	5	5	4
<b>Sin evolución</b>	37	148	32	35	26	20	36

			Clasificación quística					
SEG. EN <i>WATCH AND WAIT</i>	Pacientes	Sueros	CE1	CE2	CE3a	CE3b	CE4	CE5
		116	236	6	15	4	32	85
CON TRAT. FARMACOLÓGICO	100	264	9	16	44	131	56	8

Seguimiento tras cirugía o aspiración y tras tratamiento farmacológico: para cada punto de tiempo en el seguimiento se da el número de sueros recogidos. 0, incluye sueros recogidos antes de la intervención o justo después; 1, 2 y 3 indican los sueros recogidos durante el primero, segundo y tercer año tras el tratamiento, y >3, indica los sueros recogidos con posterioridad a los 3 años del tratamiento, llegando a los 11 años en el seguimiento tras cirugía o aspiración y 7 años en el seguimiento tras tratamiento farmacológico. Seguimiento en *watch and wait*; se da el número de sueros para cada estadio quístico. Los "pacientes con tratamiento farmacológico" no corresponden a una sucesión de sueros de seguimiento, sino a sueros de pacientes tratados solo con fármacos y cuyos sueros no tengan una fecha posterior a los dos años tras la finalización del último ciclo de tratamiento, utilizados con fines puramente comparativos.

#### **4.4. DESARROLLO DE TIRAS INMUNOCROMATO GRÁFICAS PARA EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA HIDATIDOSIS.**

##### **4.4.1. TIRAS INMUNOCROMATOGRÁFICAS PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS.**

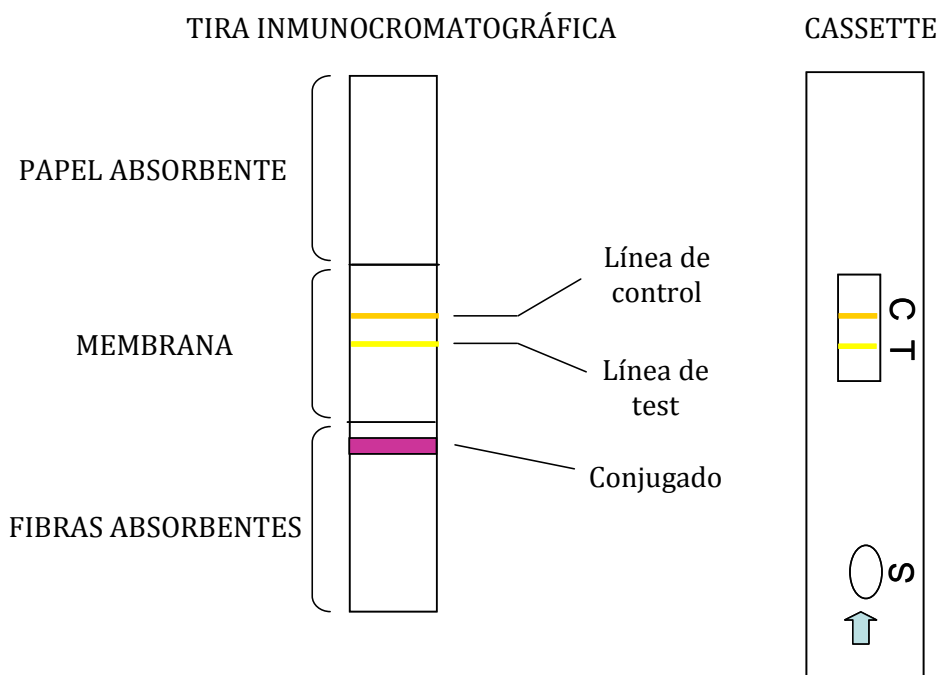
La tecnología denominada *lateral flow immunochromatographic assay* (LFIA), consiste en una tira prefabricada conteniendo reactivos secos, que basa su utilidad diagnóstica en la captura inmunológica de un coloide coloreado, conjugado con un antígeno o un anticuerpo, durante su paso a través de una membrana sobre la que se ha inmovilizado un anticuerpo o un antígeno. Estos tests se usan con profusión en diagnóstico, puesto que presentan unas características que los hacen muy útiles en este ámbito, como la rapidez y sencillez de realización e interpretación, su bajo costo, su estabilidad a temperatura ambiente y la posibilidad de utilizarlos en el mismo sitio donde se atiende al paciente, sin tener que externalizar el análisis.

Tras la evaluación de los antígenos recombinantes en ELISA, se trabajó en el desarrollo de tiras de inmunocromatografía transportando dichos antígenos recombinantes para la detección de anticuerpos específicos en suero.

##### **4.4.1.1. PRIMERA APROXIMACIÓN: DESARROLLO EN CERTEST S.L.**

Para el diseño y desarrollo de un primer prototipo de tira inmunodiagnóstica, contamos con el asesoramiento y apoyo de la empresa Certest Biotec SL (Zaragoza), donde fueron realizados todos los ensayos. Para este desarrollo, se firmó un contrato de confidencialidad, por lo que en este apartado no se realiza la descripción detallada de los materiales utilizados ni de los procedimientos llevados a cabo en la elaboración de estas tiras, sino una descripción que permite al lector un seguimiento del desarrollo de las mismas, y que consideramos suficiente para la comprensión del trabajo realizado y de los resultados obtenidos.

Para obtener un test de diagnóstico para la hidatidosis se probaron distintas condiciones y combinaciones de reactivos, basándonos en un primer momento en un formato de tira estándar (figura 13).



**Figura 13.** Esquema básico de una tira inmunocromatográfica. La primera imagen representa la tira inmunocromatográfica, que está constituida por: (i) fibras absorbentes -material que absorberá la muestra biológica líquida, llevándola hasta su extremo superior, donde se encuentran las partículas coloidales coloreadas, tapizadas con un antígeno o anticuerpo complementario al antígeno o anticuerpo que queremos detectar en la muestra (conjugado)-, (ii) membrana -material dispuesto en la parte central de la tira sobre el que discurrirán las partículas coloidales con la muestra-. Sobre su superficie se han depositado dos líneas, una de ellas es el control del test y la segunda llevará las moléculas que sean capaces de captar por una reacción antígeno-anticuerpo a la molécula de interés en la muestra ya unida a las partículas coloidales. Cuando la muestra sea positiva, aparecerá una línea de color en esta posición por la captura de las partículas coloidales coloreadas; (iii) papel absorbente, cuya función es evitar que el flujo se detenga en la membrana, obligando a este a continuar hacia el final de la tira. En la segunda imagen aparece la misma tira dentro de un *cassette* plástico con dos ventanas, una de ellas marcada con S, que sería el lugar donde se deposita la muestra y una segunda ventana donde se leerá el resultado de la prueba. C indica el lugar donde aparecerá la línea control del test y T indica el lugar donde aparecerá, si la muestra es positiva, la línea correspondiente al resultado del test.

Los sueros utilizados durante las diferentes pruebas presentaban en ELISA valores de densidad óptica que iban desde 1 a 0,4, para el caso de sueros positivos, y 0,3 a 0,1, para sueros negativos, incluyendo así sueros positivos débiles y negativos con valores elevados cercanos al valor de corte.

Los reactivos, factores y condiciones que se probaron y combinaron entre sí en las tiras fueron los siguientes:

1. Antígeno. El antígeno 2B2t se utilizó en diferentes posiciones en la tira y diferentes concentraciones.

2. Anti-anticuerpos. Anti-IgG total y varios sub-isotipos de IgG a diferentes concentraciones.

3. Materiales.

Fibras absorbentes. Tipo de fibra, longitud en la tira.

Membrana. Tamaño de poro, longitud en la tira.

Papel absorbente. Longitud en la tira.

4. Partículas coloidales conjugadas. Tamaño de las partículas, cantidad dispuesta en la tira, tampón de dilución, posición en la tira.

5. Diluciones del suero.

6. Otros formatos de tira. Además del formato convencional (figura 13), se aplicaron otros tres formatos.

Cada una de estas condiciones no se testaron secuencialmente sino que se combinaron y testaron conjuntamente para cada modelo de tira elaborada.

1. Combinaciones en línea de tira y en conjugado

El recombinante 2B2t se probó solo o en combinación con la proteína A o con anti-IgG humana total. Las posiciones y combinaciones realizadas fueron las siguientes:

A. Antígeno pegado a la membrana y a las partículas, con el fin de captar cualquier tipo de inmunoglobulina específica presente en el suero.

B. Antígeno pegado a la membrana y proteína A pegada a las partículas, de modo que a la proteína A se unirían todos los anticuerpos IgG presentes en la muestra biológica, y a la membrana se pegarían solo los anticuerpos específicos. La combinación inversa también se ensayó.

- C. Antígeno pegado a la membrana y un anticuerpo monoclonal anti-IgG total humana pegado a las partículas, funcionando de la misma manera que la combinación anterior. La combinación inversa también se ensayó.

Las combinaciones más sensibles se ensayaron con diferentes concentraciones de los reactivos (antígeno, anti-anticuerpo y proteína A), con el fin de mejorar la eficacia de la tira.

## 2. Anticuerpos

Se decidió probar a tapizar la membrana con diferentes anti-sub-isotipos de la familia de anticuerpos IgG humanos, para comprobar si el uso de alguno de ellos resultaba en un aumento de la sensibilidad de la técnica. Se probaron los anti-sub-isotipos 1, 2, 3 y 4 monoclonales (AbD Serotec) además de la ya mencionada anti-IgG total monoclonal (Medix Biochemica) y policlonal (Sigma).

Estos anticuerpos fueron testados a diferentes concentraciones en la membrana.

## 3. Materiales

En cuanto a las fibras absorbentes situadas en la base de la tira, se ensayaron diferentes texturas y longitudes de este material, para regular factores que podrían afectar a la sensibilidad y la especificidad del test, como la velocidad del flujo de la muestra en esta porción de la tira, el tiempo de contacto de la muestra biológica con las partículas coloreadas dispuestas sobre este material, y el volumen final de muestra que llegaría a interactuar con las partículas de color, ya que parte queda retenido en la red de fibras.

Sobre la membrana dispuesta en la parte central de la tira fluirán las esferas de color junto con la muestra, hasta llegar a la línea test donde se quedarán ancladas si la reacción es positiva o proseguirán hasta el final de la membrana si es negativa. Los factores con los que aquí experimentamos fueron el tamaño de poro de la membrana, probándose tres tamaños, y la longitud del recorrido de la muestra junto con las esferas, es decir, la longitud de la membrana en la tira. Estos dos factores estarán muy relacionados con la sensibilidad y especificidad del test, ya que afectan a la velocidad

del flujo. En general, a mayor velocidad tendremos menos falsos positivos y un fondo más limpio, pero también se verá un descenso en la sensibilidad, porque acortamos el tiempo de contacto entre las moléculas de interés en la muestra biológica, en este caso los anticuerpos específicos, con la línea test. Se hicieron pruebas con estas variables con el objetivo de conseguir el mejor binomio sensibilidad/especificidad.

En el extremo superior de la tira se dispuso un papel absorbente de longitud variable con el fin de controlar la velocidad del flujo mediante una mayor o menor absorción.

Cada una de las opciones ensayadas, en cuanto a los materiales, se probaron con distintas concentraciones del antígeno e inmunoglobulinas, diferentes concentraciones de partículas coloidales conjugadas sobre las fibras absorbentes, diferentes tamaños de las microesferas, así como con distintos tampones de dilución.

#### 4. Partículas coloidales conjugadas.

También denominadas “conjugados”, son partículas esféricas coloreadas unidas mediante interacción covalente a una molécula que nos permitirá captar el elemento de interés por su unión a dicha molécula, en este caso las inmunoglobulinas específicas que se unirán al antígeno recombinante utilizado para la conjugación.

Con el fin de ajustar la sensibilidad y especificidad de la tira, los factores que variamos fueron el tamaño de la partícula (se testaron cuatro tamaños diferentes), la cantidad de conjugado dispuesto en la tira, la concentración del antígeno en la superficie de la esfera y el tampón de dilución de los conjugados antes de depositarlos y secarlos en la tira. Para cada una de las variables ensayadas también se probaron distintas concentraciones de inmunoglobulinas sobre la membrana y distintos tipos de materiales.

Todas estas variables fueron combinadas entre sí para dar con la fórmula de la tira que alcanzara la mayor sensibilidad, con la mayor especificidad posible.

#### 5. Dilución del suero

Para la dilución de los sueros probamos con un amplio set de tampones diluyentes, cuya composición variaba en la concentración de sales, presencia de detergentes, presencia de bloqueantes y pH. Cada uno de ellos fue probado con cada

tira construida sin el suero, eligiéndose para cada formato aquel tampón con el que no se obtuvieran falsos positivos.

Tras elegir el tampón, probamos las tiras con un *pool* de sueros con densidad óptica muy alta en la técnica ELISA y un *pool* de sueros de donantes, en diluciones seriadas hasta la 1:1000.

Una vez determinado el rango de dilución con el que se detectaba señal, se utilizó el resto de sueros positivos con densidades ópticas más bajas para elegir la dilución y volumen final a añadir, que resultasen los más adecuados para detectar como positivos los sueros correspondientes a pacientes con hidatidosis y como negativos aquellos sueros de donantes sanos.

#### 6. Otros formatos de tira

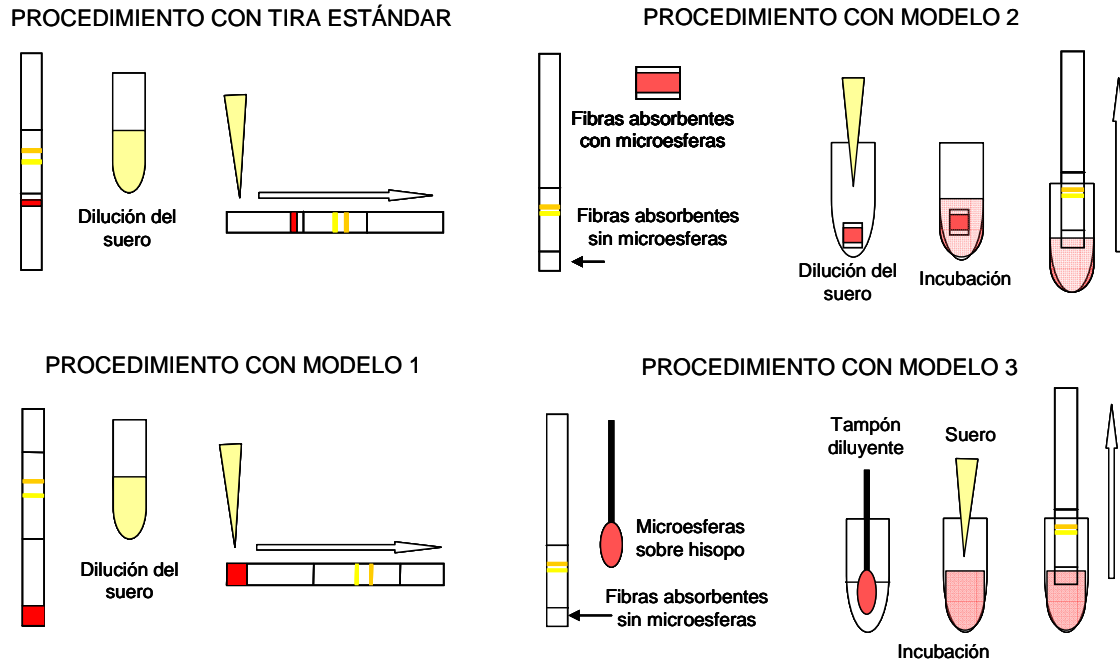
Además del formato de tira mostrado en la figura 13, se diseñaron otros tres modelos para intentar aumentar la sensibilidad del test.

El objetivo de estos modelos fue aumentar el tiempo de contacto entre la muestra y las microesferas, de modo que los anticuerpos tuviesen más tiempo para unirse específicamente al conjugado. En el primer modelo la tira es similar a la estándar, a diferencia de la posición del conjugado, que en la tira estándar se encuentra en la parte superior de las fibras absorbentes, y que en este caso se depositó en la base del material de dichas fibras, para propiciar así un mayor tiempo de contacto entre muestra y conjugado. Este modelo se ensayó con diferentes longitudes de las fibras absorbentes.

En los otros dos modelos, las microesferas se depositan fuera de la tira bien en una pequeña porción de tejido de fibras absorbentes o sobre un hisopo que se incubaba con la muestra diluida en un tubo eppendorf (figura 14).

Para estos tres modelos, se probaron las mismas variables que para el modelo estándar en cuanto a los materiales, concentración de antígeno en las esferas y anticuerpos en membrana, tamaño y cantidad de los conjugados y tampones de dilución.





**Figura 14.** Esquema de los diferentes prototipos de tira utilizados y su modo de uso. El procedimiento con la tira de modelo estándar consiste en diluir el suero, aplicarlo sobre la base de la tira y esperar a la lectura del test. En este modelo el tiempo de contacto de la muestra con los conjugados dependerá de la velocidad del flujo a lo largo de la membrana. El modelo 1 se realiza de la misma manera que el estándar siendo también necesaria la dilución previa del suero. En este caso aumentamos el tiempo de contacto entre muestra y conjugado puesto que se aumenta el recorrido de los conjugados con la muestra hasta llegar a la línea test despositada sobre la membrana. En el modelo 2, los conjugados se encuentran sobre fibras absorbentes que se incuban con el suero diluido. Este modelo nos permite controlar el tiempo de contacto de los conjugados con la muestra. Tras este período se sumerge el extremo basal de la tira, que en este caso la porción de material fibroso absorbente será más corta que en el modelo estándar, en la muestra diluida donde ahora también estarán los conjugados comenzando la cromatografía. El modelo 3 es muy similar al anterior aunque los conjugados se encuentran en la superficie de un hisopo que se sumergirá en el tampón de dilución. Cuando las microesferas se despegan del hisopo se añade la muestra y esta solución se incuba durante un tiempo tras el cual se sumergirá el extremo inferior de la tira para comenzar la cromatografía.

#### 4.4.1.1.1. COMPARACIÓN DE LAS TIRAS INMUNOCROMATOGRÁFICAS DE CERTEST CON EL ELISA Y DOS TESTS COMERCIALES

Una vez seleccionado el tipo de tira definitiva, que fue el modelo estándar conteniendo el antígeno 2B2t en el conjugado y un anticuerpo anti-IgG4 monoclonal en la tira, su sensibilidad y especificidad fue comparada con la técnica ELISA utilizando el mismo antígeno recombinante y con el test comercial de HAI de Fumouze, que contiene el antígeno 5 nativo purificado.

El panel de sueros utilizado incluyó los 186 sueros de pacientes de Perú con hidatidosis, 110 sueros de individuos sanos, 36 sueros de pacientes con hepatitis (15 con hepatitis B y 21 con hepatitis C) recogidos en el Hospital Clínico Universitario de Salamanca, y 73 sueros de pacientes con parásitos relacionados con *E. granulosus*. De estos, 57 sueros eran de pacientes peruanos con neurocisticercosis, 6 sueros de pacientes con hidatidosis alveolar procedentes de Suiza y 10 pacientes de Perú con teniosis.

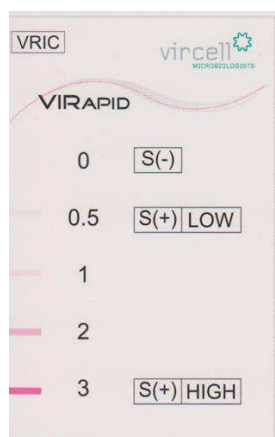
El kit de HAI se utilizó tal como se detalla en el apartado 4.2.2. y el ELISA, tal y como se detalla en el apartado 4.2.1 dentro del capítulo Materiales y Métodos.

Nuestras tiras se ensayaron como se detalla a continuación. Sobre la ventana del *cassette* plástico marcado con la letra S (figura 13), se depositaron 100 µl de la muestra diluida a razón 1:10 (10 µl del suero y 90 µl del tampón de dilución). Tras 10 minutos de espera se procedió a la lectura del resultado del test donde la aparición de una línea roja en la posición marcada con la letra T indicó la positividad del mismo.

Las tiras desarrolladas en Certest se compararon posteriormente con otro kit comercial, también basado en la inmunocromatografía (VIRapid® HYDATIDOSIS), de la casa comercial Vircell. La diferencia principal entre este test comercial y el desarrollado por nosotros se encuentra en los antígenos utilizados. Vircell utiliza como antígeno una fracción purificada por HPLC del LH, enriquecida en los antígenos 5 y B. Además, también se diferencia en que estos antígenos nativos se sitúan tanto en la línea test como en el conjugado. Otras diferencias con respecto a nuestro desarrollo es que este test utiliza partículas de oro, y que presenta un paso de incubación del suero con las partículas conjugadas dispuestas en las fibras absorbentes por un tiempo no mayor a 5 minutos. Tras este período se añade el tampón de dilución que

arrastra el suero junto con las partículas por la membrana. El test de Vircell se lee tras un tiempo de espera de 30 minutos, comparando la intensidad de la línea con un patrón de intensidad suministrado con el kit, cuya escala va del 0 al 3 (figura 15), de modo que para una intensidad inferior al valor 0,5, la prueba se consideraba negativa y cuando es mayor que este valor, positiva.

Las tiras inmunocromatográficas de Vircell se ensayaron siguiendo las instrucciones dadas por la casa comercial que fueron las siguientes. Se dosificó sobre el pocillo 30 µl de la muestra esperando a que esta fuera absorbida durante un tiempo no superior a 5 minutos (nosotros esperamos 1 minuto y 30 segundos para todas las muestras testadas). Se añadieron 2 gotas de la solución de revelado en el pocillo y los resultados fueron leídos a los 30 minutos.



**Figura 15.** Patrón de intensidad de la línea test para la interpretación del resultado del test inmunocromatográfico de Vircell. 0 y S(-), indican que la muestra utilizada es negativa; 0.5 y S(+) LOW, indica que el resultado de la prueba es un positivo débil en el límite de la positividad; 1 y 2, indica que la muestra es positiva; 3 y S(+) HIGH, indica un resultado positivo muy fuerte.

Estas tiras con antígeno nativo se compararon directamente con las desarrolladas por nosotros en Certest Biotec, utilizando un panel de sueros que incluía 50 muestras de pacientes con hidatidosis, cedidas por el Hospital Universitario de Valladolid, y 34 sueros de donantes.

#### 4.4.1.2. SEGUNDA APROXIMACIÓN: DESARROLLO EN VIRCELL SL

La empresa Vircell mostró su interés por sustituir el antígeno nativo que utilizan en su tira por el antígeno recombinante 2B2t. Los detalles metodológicos acerca del desarrollo de dichas tiras son también objeto de un contrato de confidencialidad. La tira que mejor funcionó conteniendo el antígeno 2B2t

recombinante, combinaba el antígeno nativo purificado (fracción 5 y B del LH) y un anticuerpo policlonal anti-IgG4 humano, ambos conjugados en las partículas de oro, y el 2B2t en la línea de la tira. Estas tiras se denominarán de aquí en adelante tiras Vircell recombinantes o Vircell-2B2t.

#### 4.4.1.2.1. COMPARACIÓN DE LOS DOS TESTS INMUNOCROMATOGRÁFICOS ELABORADOS EN VIRCELL JUNTO CON EL ELISA 2B2t

Las nuevas tiras desarrolladas con el antígeno recombinante se compararon con las originales de Vircell, denominadas de aquí en adelante tiras Vircell nativas. Ambas tiras se utilizaron siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial para las tiras nativas (ver apartado anterior), ensayando un panel de 475 sueros (tabla 11). De estos, 385 eran de pacientes de Italia y Alemania con distintas características clínicas, 50 de pacientes con hidatidosis alveolar (de los cuales 8 fueron positivos en el ELISA-2B2t), cuatro *pools* de pacientes con neurocisticercosis (dos *pools* de sueros negativos –uno de pacientes peruanos y otro de pacientes mejicanos-, uno de positivos altos, y uno de positivos medios según su reactividad en el ELISA-2B2t), y 36 sueros de donantes (uno positivo en ELISA-2B2t). Para ambas se calculó la especificidad, además de la sensibilidad dependiendo de las características clínicas del paciente. Estos resultados fueron a su vez comparados con el ELISA usando como antígeno el recombinante 2B2t.

Para comparar la eficiencia diagnóstica de cada test se calcularon los valores de área bajo la curva ROC (ABC). Las curvas ROC se construyeron mediante la representación de los valores de sensibilidad y 1-especificidad para cada uno de los valores de intensidad de la línea test obtenida con cada suero en el caso de las tiras inmunocromatográficas (figura 15) y, en el caso del ELISA-2B2t para cada uno de los valores de IS. En la construcción de las curvas ROC se incluyeron como verdaderos positivos los sueros de pacientes con hidatidosis, y como verdaderos negativos, los sueros de donantes sanos y los de aquellos pacientes con otras patologías.

Tras determinar la sensibilidad, especificidad y eficiencia diagnóstica de cada uno de los tests, se estudiaron los factores que podrían estar afectando a la sensibilidad de las tiras de Vircell en comparación con el ELISA. Para ello los sueros

de hidatidosis fueron agrupados según las características clínicas disponibles. Las diferencias entre los distintos grupos en cuanto a la sensibilidad mostrada se evaluaron estadísticamente mediante el test chi-cuadrado. Mediante un análisis de regresión logística binaria bivariante se calcularon los valores de odds ratio (OR) para cada característica clínica, y con un análisis de regresión logística binaria multivariante se analizaron en conjunto aquellas que mostraron ser las más influyentes en el resultado de los tests de inmunodiagnóstico, para discernir cuáles son los factores que combinadamente y de forma más directa afectan a cada test diagnóstico.

Además del valor diagnóstico de cada tipo de tira, también se quiso evaluar su utilidad en el seguimiento de pacientes tratados.

Para ello, ambas tiras fueron enfrentadas a un total de 68 sueros de 19 pacientes curados tras tratamiento quirúrgico o aspiración, recogidos a diferentes intervalos de tiempo tras la intervención. De la misma manera se seleccionaron 35 sueros de 10 pacientes no curados tras cirugía o aspiración. Los resultados fueron comparados con el ELISA realizado con el mismo recombinante 2B2t.

**Tabla 11.** Sueros utilizados en la comparación de las tiras Vircell nativas, tiras Vircell recombinantes y el ELISA-2B2t.

<b>SUEROS DE PACIENTES CON HIDATIDOSIS</b>		
	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Clasificación quística</b>		
CE1	25	6,5
CE2	23	6,0
CE3a	51	13,2
CE3b	140	36,4
CE4	107	27,9
CE5	39	10,2
<b>Localización quística</b>		
Hígado	365	94,8
Otras	20	5,2
<b>Número de quistes</b>		
Único	233	60,5
Múltiple	152	39,5
<b>Toma del suero</b>		
Antes del tratamiento	225	58,4
Después del tratamiento	160	41,5

<b>OTROS SUEROS</b>		
	<b>N</b>	<b>%</b>
Donantes	36	40,0
Hidatidosis alveolar	50	55,5
Neurocisticercosis	4	4,4

N, número de sueros; %, porcentaje representado.

**Tabla 12.** Sueros utilizados para el estudio de la utilidad de las tiras diagnósticas en el seguimiento de pacientes curados y no curados tras una intervención quirúrgica o una aspiración.

		<b>Pacientes</b>	<b>Sueros</b>	<b>Tiempo tras tratamiento</b>				
<b>SEGUIMIENTO TRAS CIRUGÍA O ASPIRACIÓN</b>	<b>TOTAL</b>	29	103	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>&gt;3</b>
	<b>Curados</b>	19	68	16	22	12	7	11
	<b>No curados</b>	10	35	4	7	6	5	13

Para cada punto de tiempo en el seguimiento se da el número de sueros recogidos. 0, incluye sueros recogidos antes de la intervención o justo después; 1, 2 y 3 indican los sueros recogidos durante el primero, segundo y tercer año tras el tratamiento, y >3, indica los sueros recogidos con posterioridad a los 3 años del tratamiento, llegando a los 11 años.

#### 4.4.2. TIRAS INMUNOCROMATOGRÁFICAS PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS

Además del test de diagnóstico rápido para la detección de anticuerpos específicos, se diseñó una tira para la detección del antígeno B2 o sus epítomos en diferentes muestras clínicas. Para desarrollarla, se obtuvieron anticuerpos en conejos inmunizados con el antígeno en tándem 4B2t. Se realizaron 3 inmunizaciones, dejando una semana entre cada una de ellas, con 50 µg de recombinante más 100 µg de saponina, en un volumen final de 400 µl de PBS para cada inmunización. Dos semanas después de la última inmunización, se procedió al sangrado de los animales, a través del vaso sanguíneo situado en la parte posterior de la oreja. La sangre así extraída se centrifugó a 4.000 rpm para recoger los sueros, que se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Los anticuerpos presentes en el suero hiperinmune fueron purificados por cromatografía de afinidad en una columna HiTrap NHS-Activated HP (GE Healthcare Life Sciences) a la que previamente se le había acoplado como ligando específico el antígeno 4B2t, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Una vez purificados y calculada su concentración mediante espectrometría, se dispusieron en la línea test de la membrana y se conjugaron con las partículas de látex.

Para un primer ensayo se utilizaron las tiras en condiciones estándar (figura 13) y después para lograr un aumento de la sensibilidad se fueron modificando los factores que se enumeran a continuación:

1. Membrana. Tamaño de poro, concentración del anticuerpo.
2. Conjugado. Tamaño de la partícula, concentración del anticuerpo sobre su superficie, cantidad de conjugado en la tira.
3. Tampones. Diferentes tampones de dilución de las microesferas y de la muestra, diferentes volúmenes finales de los mismos.

En las primeras pruebas se testó la reactividad de los anticuerpos utilizando como muestra diluciones seriadas del antígeno B2t recombinante de concentraciones conocidas. Los prototipos seleccionados (aquellos que daban reacción con el antígeno

B2t), se ensayaron con diluciones seriadas de líquido hidatídico con una concentración proteica conocida.

Una vez determinado el prototipo definitivo, la especificidad de este se comprobó mediante la comparación de la reactividad de distintas preparaciones antigénicas utilizadas como muestra sobre la tira, a una concentración proteica total igual. Estas muestra fueron las siguientes: tres LHs de quistes únicos de *Echinococcus granulosus* procedentes de un paciente, de una oveja, y de un camello; LH de *E. multilocularis* (quistes obtenidos *in vitro*); LH de un quiste de *Echinococcus vogeli*; fluido de cisticercos de *Taenia crassiceps* y de *Taenia solium*, todos ellos donados por el Instituto de Parasitología de la Universidad de Berna (Suiza).

Para el ensayo de estas muestras se dispensaron sobre el pocillo de la tira marcado como S (figura 13) 120 µl de la muestra sin diluir o diluida con agua destilada (diluciones de la muestra menores de 1:10) en caso de que la muestra fuera muy viscosa. Tras 10 minutos de incubación se procedió a la lectura de los resultados, siendo positivos cuando se visualizó una línea roja junto al indicador T (figura 13).



## **5. RESULTADOS**

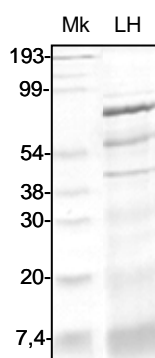
---



## 5.1. ANTÍGENOS

### 5.1.1. LÍQUIDO HIDATÍDICO

El líquido hidatídico (LH) de quistes ovinos fértiles fue liofilizado, para resuspenderlo en agua destilada estéril a una concentración proteica mayor a la original. La concentración proteica de esta solución se determinó con el kit MicroBCA Protein Assay (Pierce), siendo de 36 mg/ml. La posible proteólisis de las proteínas del LH se descartó por visualización de su patrón típico en un gel de acrilamida teñido con Coomasie (figura 16).



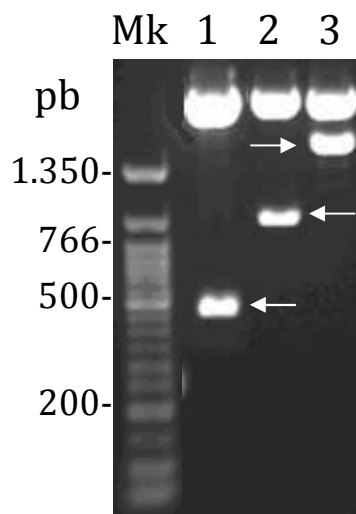
**Figura 16.** Patrón proteico del líquido hidatídico. Gel de poliacrilamida al 12%, mostrando el patrón proteico típico del líquido hidatídico (LH), de la muestra que se utilizó como antígeno en la técnica de ELISA, teñido con Azul de Coomasie. Mk, marcador de peso molecular en kilodaltons (BioRad).

### 5.1.2. PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para la obtención de la proteína recombinante B2t en tándem, en diferente número de copias, se obtuvieron secuencias clonadas en el vector pGEM-T-EASY de 446 pb correspondiente con la secuencia de la proteína 2B2t, de 874 pb que se corresponde con el tándem 4B2t y de 1.738 pb para el caso del 8B2t, todos ellos acordes al tamaño esperado. Las secuencias resultantes para cada antígeno se muestran en la figura 17 junto con las bandas obtenidas tras restricción con *EcoRI* del plásmido pGEM-T-EASY en gel de agarosa.



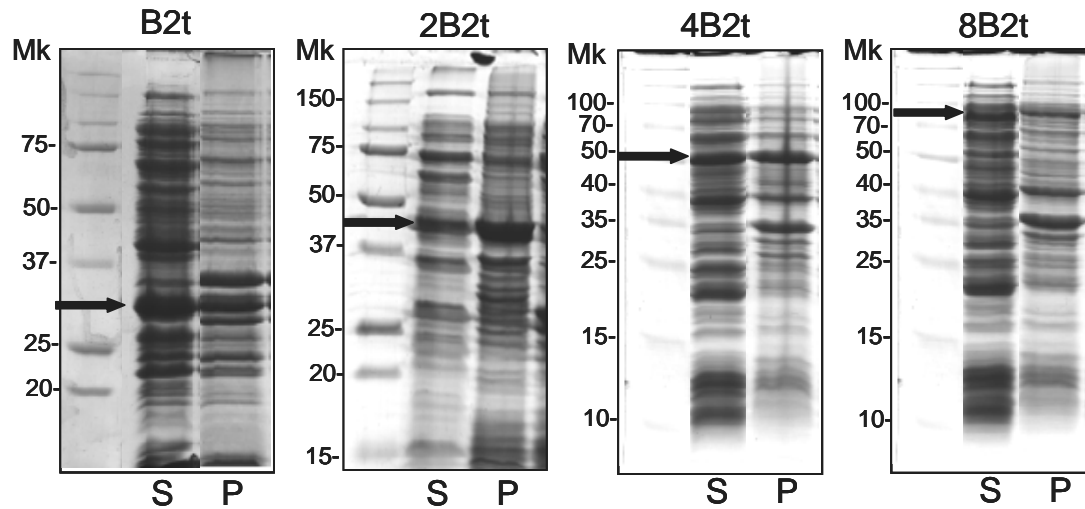
## B



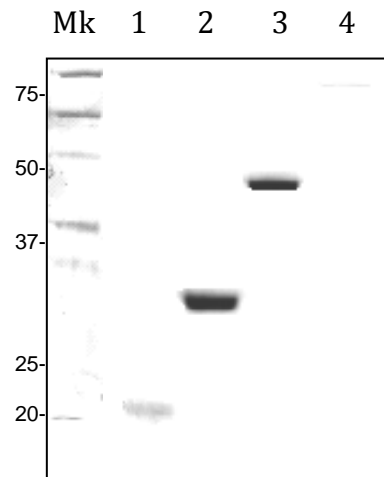
**Figura 17.** Construcción de las secuencias B2t repetidas en tándem. A. Se muestran las secuencias nucleotídicas de cada uno de los tándems construidos, así como su longitud en pares de bases. En gris se señalan las secuencias de unión entre cada unidad B2t, formadas por la ligación de los sitios de restricción *Bam*HI y *Bgl*II. Las secuencias subrayadas marcan la posición de los cebadores utilizados. B. Gel de agarosa tras digestión con *Eco*RI de los vectores pGEM-T-EASY conteniendo los diferentes tándems, marcados con flechas. Mk, marcador de peso molecular; 1, pGEM-T-EASY-2B2t, 2, pGEM-T-EASY-4B2t y 3, pGEM-T-EASY-8B2t.

Todas las proteínas fueron expresadas en el vector pGEX-4T1, y se observaron tanto en el sobrenadante como en el pellet de las células de expresión (figura 18A). La cantidad final de proteína purificada y cortada con trombina fue diferente para cada recombinante. La proteína 2B2t fue la que mostró un mayor rendimiento, obteniéndose alrededor de 2,5 mg por litro de medio de cultivo procesado, aproximadamente el doble de la cantidad que se obtuvo durante la producción y purificación de la proteína B2t (1,2 mg/l). Sin embargo, el rendimiento en la producción de 4B2t no fue 4 veces superior a la B2t como cabría esperar, sino que fue levemente inferior al obtenido para la 2B2t. El tándem de 8 copias, 8B2t, dio lugar a un rendimiento muy bajo, tal y como se muestra en la figura 18B, por lo que se descartó su uso.

**A**



**B**



**C**

**2B2t**

GSPEFDYRSKDEPKAHMGQVVKKRWGELRDFFRNDPLGQRLVALGNDLTAICQKLQLKIREVLKKYVKNLVEE  
 KDDDSKSGKDEPKAHMGQVVKKRWGELRDFFRNDPLGQRLVALGNDLTAICQKLQLKIREVLKKYVKNLVEEK  
 DDDSKGSIITSEFPGRLEPHRDStop

169 aminoácidos -16,9 kDa

**4B2t**

GSPEFDYRSKDEPKAHMGQVVKKRWGELRDFFRNDPLGQRLVALGNDLTAICQKLQLKIREVLKKYVKNLVEE  
 KDDDSKSGKDEPKAHMGQVVKKRWGELRDFFRNDPLGQRLVALGNDLTAICQKLQLKIREVLKKYVKNLVEEK  
 DDDSKGSKDEPKAHMGQVVKKRWGELRDFFRNDPLGQRLVALGNDLTAICQKLQLKIREVLKKYVKNLVEEKD  
 DSKGSIITSEFPGRLEPHRDStop

313 aminoácidos -31,3 kDa

**8B2t**

GSPEFDYRSKDEPKAHMGQVVKRWGELRDFFRNDPLGQRLVALGNDLTAICQKLQLKIREVLKKYVKNLVEEK  
 KDDDSKSGSKDEPKAHMGQVVKRWGELRDFFRNDPLGQRLVALGNDLTAICQKLQLKIREVLKKYVKNLVEEK  
 DDDSKSGSKDEPKAHMGQVVKRWGELRDFFRNDPLGQRLVALGNDLTAICQKLQLKIREVLKKYVKNLVEEKD  
 DDDSKSGSKDEPKAHMGQVVKRWGELRDFFRNDPLGQRLVALGNDLTAICQKLQLKIREVLKKYVKNLVEEKDD  
 DSKSGSKDEPKAHMGQVVKRWGELRDFFRNDPLGQRLVALGNDLTAICQKLQLKIREVLKKYVKNLVEEKDDD  
 SKSGSKDEPKAHMGQVVKRWGELRDFFRNDPLGQRLVALGNDLTAICQKLQLKIREVLKKYVKNLVEEKDDDD  
 SKSGSKDEPKAHMGQVVKRWGELRDFFRNDPLGQRLVALGNDLTAICQKLQLKIREVLKKYVKNLVEEKDDDD  
 KSGSKDEPKAHMGQVVKRWGELRDFFRNDPLGQRLVALGNDLTAICQKLQLKIREVLKKYVKNLVEEKDDDDSK  
 GSKDEPKAHMGQVVKRWGELRDFFRNDPLGQRLVALGNDLTAICQKLQLKIREVLKKYVKNLVEEKDDDDSK  
 SIITS~~EFFPGRLE~~RPHRDStop

601 aminoácidos -60,1 kDa

**Figura 18.** Proteínas recombinantes 2B2t, 4B2t y 8B2t. A. Geles de poliacrilamida en los que se señala la posición de cada una de las proteínas de fusión con GST en el pellet celular (P) y sobrenadante (S) obtenidos tras la centrifugación de las células sonicadas. B. Gel de poliacrilamida con las bandas correspondientes a las proteínas recombinantes purificadas tras el corte con trombina, en el que se incluye la proteína “madre” B2t con el fin de comparar el rendimiento de producción de las nuevas proteínas con el de la B2t. 1, B2t; 2, 2B2t; 3, 4B2t; 4, 8B2t. Se indican los marcadores de peso molecular (Mk) en kilodaltons (kDa) a la izquierda del panel. C. Secuencias aminoacídicas de cada una de las proteínas en tándem, tras el corte con trombina. En gris, se indican los aminoácidos que se añaden a la secuencia específica parasitaria por el proceso de clonación, codificados por el vector. “Stop”, codón de terminación. En la figura se indican los pesos moleculares de cada una de las proteínas en kDa.

## 5.2. CARACTERIZACIÓN DIAGNÓSTICA DE LOS DISTINTOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES EN ELISA

### 5.2.1. PRIMERA SELECCIÓN DE ANTÍGENOS EN ELISA

La evaluación preliminar de la utilidad diagnóstica de las proteínas recombinantes 2B2t y 4B2t en ELISA se hizo con 49 sueros de donantes sanos y 54 de pacientes con hidatidosis confirmada quirúrgicamente, que fueron seleccionados según los resultados de reactividad contra la proteína recombinante B2t en ELISA.

Como se muestra en la tabla 13, la mayor sensibilidad se obtuvo con el antígeno 2B2t (92,6%) seguido por el LH (81,5%) y el antígeno 4B2t (79,6%). Los antígenos 2B2t y 4B2t mostraron una sensibilidad mayor con este panel de sueros que el antígeno B2t (77,8%). La especificidad mostrada con los 49 sueros de donantes sanos para el antígeno 4B2t fue solo del 79,6%, menor que la correspondiente al LH (93,9%) y que a la de los otros dos antígenos recombinantes (95,9%).

Basándonos en los resultados mencionados, los subsecuentes estudios serológicos se desarrollaron con los antígenos B2t y 2B2t, mientras que el 4B2t fue descartado por su baja especificidad, y por mostrar una sensibilidad menor que la del antígeno recombinante 2B2t, encontrándose que los pacientes con un resultado falso negativo en el ELISA-2B2t mostraban el mismo resultado en ELISA-4B2t.

**Tabla 13.** Análisis comparativo del valor diagnóstico del líquido hidatídico (LH) y de los antígenos recombinantes B2t, 2B2t y 4B2t con un panel de sueros definidos, en ELISA-IgG.

	Casos confirmados, n=54 (Sensibilidad)			Donantes, n=49 (Especificidad)
	Todos (n=54)	B2t negativos (n=12)	B2t positivos (n=42)	
<b>LH</b>	44 (81,5%)	4 (33%)	40 (95,2%)	3 (93,9%)
<b>B2t</b>	42 (77,8%)	0 (0%)	42 (100%)	2 (95,9%)
<b>2B2t</b>	50 (92,6%)	9 (75%)	41 (97,6%)	2 (95,9%)
<b>4B2t</b>	43 (79,6%)	3 (25%)	40 (95,2%)	10 (79,6%)

Se muestra el número de muestras positivas frente a cada antígeno, y la sensibilidad y especificidad entre paréntesis, en porcentaje. n=número de muestras.

### 5.2.2. COMPARACIÓN DE LOS DISTINTOS ANTÍGENOS EN ELISA CON UNA TÉCNICA COMERCIAL DE HAI. INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

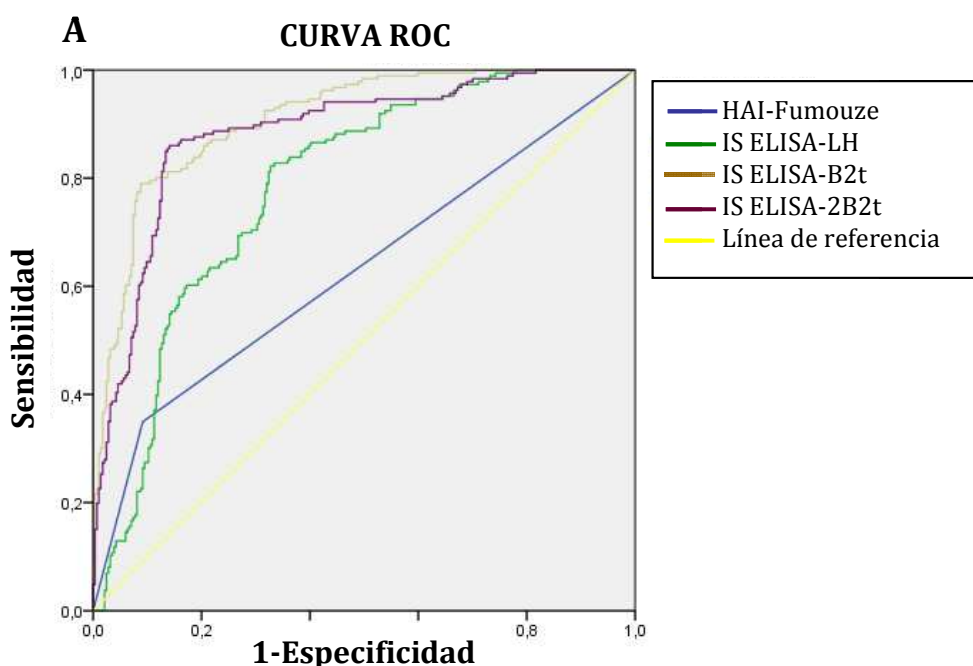
Una vez descartado el antígeno 4B2t, se compararon los antígenos B2t y 2B2t con el LH en ELISA, y también con un kit comercial de hemaglutinación indirecta (HAI; Fumouze Diagnostics, Francia) de uso habitual en hospitales utilizando un panel de sueros mayor, que consistió en 186 sueros de pacientes de Perú con hidatidosis, 110 sueros de donantes sanos y 174 sueros de pacientes con diferentes patologías, tal y como se detalla en Materiales y Métodos.

Con los valores de IS obtenidos tras el ELISA junto con el valor positivo o negativo de la HAI con los sueros arriba mencionados, se construyó una curva ROC para cada uno de los tests (figura 19A), a partir de la cual se calculó el valor del área



bajo la curva (ABC) (figura 19B), como indicador de validez a la hora de comparar las diferentes pruebas diagnósticas.

La técnica que mostró una mayor utilidad para el diagnóstico fue el antígeno B2t en ELISA con un valor de ABC=0.910, seguida por el 2B2t (ABC=0.884) y por el LH (ABC=0.785). La HAI mostró el valor más bajo con un ABC=0.629, siendo el test menos eficiente para el diagnóstico de la hidatidosis. Las diferencias encontradas entre los valores de ABC de las distintas pruebas fueron significativas estadísticamente según la prueba de homogeneidad de áreas.

**B**

ÁREA BAJO LA CURVA				
Variables resultado de contraste	Área	Error típico.	Sig. asintótica	Intervalo de confianza
HAI Fumouze	0,629	0,027	0,000	0,576-0,682
IS ELISA LH	0,785	0,021	0,000	0,744-0,826
IS ELISA B2t	0,910	0,013	0,000	0,884-0,936
IS ELISA 2B2t	0,884	0,016	0,000	0,853-0,916

a. Bajo el supuesto no paramétrico

## C

	PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE ÁREAS					
	ELISA-LH		ELISA-B2t		ELISA-2B2t	
	Ji-cuadrado	Valor P	Ji-cuadrado	Valor P	Ji-cuadrado	Valor P
HAI Fumouze	88,43	0,000	241,1	0,000	187,45	0,000
ELISA-LH			38,96	0,000	22,87	0,000
ELISA-B2t					4,13	0,042

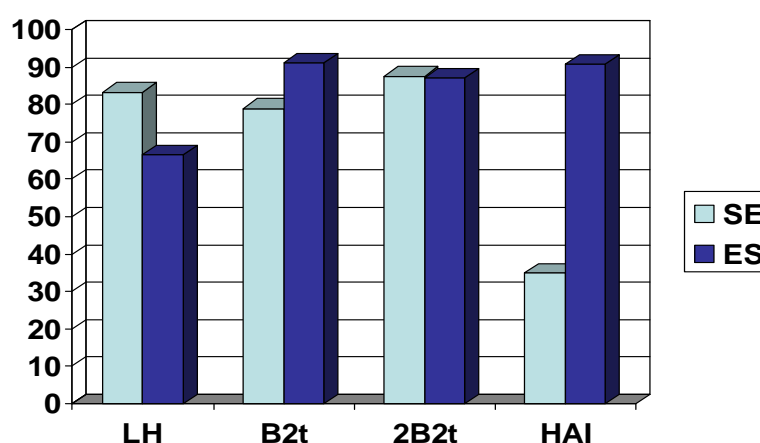
**Figura 19.** Comparación de la eficiencia diagnóstica de los recombinantes B2t y 2B2t con el LH en ELISA-IgG y con el test comercial de HAI mediante curva ROC. A. Curva ROC de cada uno de los test llevados a cabo. La curva fue construida con los valores de IS obtenidos con los 186 sueros de pacientes con hidatidosis de Perú y con los 284 sueros de individuos sanos, con hepatitis y con parasitosis relacionadas para cada test diagnóstico. B. Cálculo del área bajo la curva ROC de cada test, indicándose también el error estándar, significancia e intervalo de confianza al 95%. C. Diferencias significativas entre los valores de ABC calculados tras la comparación dos a dos de las pruebas diagnósticas.

Para realizar un análisis más detallado de cada una de las herramientas diagnósticas aquí testadas, además del cálculo de la validez global del test, también se realizó el cálculo de la sensibilidad, especificidad y reacciones cruzadas para cada una de las pruebas diagnósticas. Las curvas ROC se utilizaron también para calcular el valor de corte aplicable, que fue IS=50 para todos los antígenos en ELISA. La sensibilidad obtenida con los 186 pacientes con hidatidosis fue de 83,3%, 79% y 87,6% para los antígenos LH, B2t y 2B2t en ELISA respectivamente, y de 34,9% para el kit de HAI (tabla 14). La evaluación de los 4 tests con los sueros de donantes mostró al kit de HAI como el más específico, seguido por el, ELISA-2B2t y ELISA-B2t, y por último por el ELISA-LH (tabla 14). En cuanto a las reacciones cruzadas, las menos numerosas fueron con el ELISA-B2t, seguido de la HAI, el ELISA-2B2t y el ELISA-LH (tabla 14). Las principales reacciones cruzadas para cada uno de los antígenos fueron: hidatidosis alveolar para el LH y la HAI, y neurocisticercosis (pacientes de Perú) para los dos antígenos recombinantes. Es de mencionar que el elevado porcentaje de reacciones cruzadas detectadas con los pacientes de Perú que sufrían de neurocisticercosis, no tuvieron un paralelo con las detectadas sobre los pacientes con neurocisticercosis de México, que dieron lugar a un porcentaje muy bajo de reacciones cruzadas con los antígenos B2t y 2B2t.

**Tabla 14.** Comparación de la sensibilidad, especificidad y reacciones cruzadas de los antígenos recombinantes B2t, 2B2t y del LH en ELISA-IgG, y del kit comercial de hemaglutinación indirecta (HAI).

	LH- ELISA	B2t- ELISA	2B2t- ELISA	HAI
<b>Casos confirmados, n=186 (Sensibilidad)</b>	155 (83,3%)	147 (79,0%)	163 (87,6%)	65 (34,9%)
<b>Donantes, n=110 (Especificidad)</b>	5 (95,4%)	1 (99,1%)	1 (99,1%)	0 (100%)
<b>Reacciones cruzadas, n=174</b>				
Hidatidosis alveolar, n=57	57 (100%)	7 (12,3%)	10 (17,5%)	24 (42,1%)
Neurocisticercosis Méjico, n=13	7 (53,8%)	1 (7,7%)	0 (0%)	0 (0%)
Neurocisticercosis Perú, n=57	22 (38,6%)	14 (24,6%)	21 (36,8%)	1 (1,7%)
Teniosis Perú, n=11	4 (36,4%)	1 (9,1%)	2 (18,2%)	0 (0%)
Hepatitis, n=36	0 (0%)	1 (2,8%)	1 (2,8%)	1 (2,8%)
<b>Especificidad total (RC+donantes), n=284</b>	95 (66,5%)	25 (91,2%)	35 (87,7%)	26 (90,8%)

Los resultados son mostrados como número de sueros positivos frente a las diferentes herramientas diagnósticas, y las sensibilidades, especificidades y reacciones cruzadas correspondientes se muestran entre paréntesis como porcentajes. n, número, RC, reacciones cruzadas.



**Figura 20.** Sensibilidad y especificidad global incluyendo reacciones cruzadas, obtenidas cada uno de los antígenos y el kit de HAI. La sensibilidad mostrada (SE) es la obtenida con los sueros de pacientes con hidatidosis de Perú. La especificidad mostrada (ES) se corresponde a

la total calculada con los sueros de donantes sanos, pacientes con hepatitis y otras parasitosis relacionadas.

Tras determinar la sensibilidad, especificidad y reacciones cruzadas de cada uno de los tests, se estudiaron los factores relacionados con variables clínicas que podrían estar afectando a la sensibilidad de nuestros antígenos y al test comercial de HAI. Estas variables incluyeron el número de quistes (uno o más de uno), su localización (hígado o pulmón), clasificación de la OMS (quistes hepáticos que fueron agrupados en dos subgrupos: CE1 y CE2 a CE4, para tener un número representativo de casos en cada subgrupo), complicaciones (51 pacientes con quistes rotos e infectados en 47), haber sufrido previamente una hidatidosis (antecedentes) y fecha de colecta de suero con respecto a la del inicio del tratamiento (de los 57 pacientes cuyo suero fue colectado después de tratamiento, 55 habían sido tratados por cirugía y dos solo con albendazol).

Para ello los sueros de pacientes de hidatidosis procedentes de Perú fueron agrupados según las características clínicas disponibles, calculándose para cada una de las opciones la sensibilidad con cada uno de los tests utilizados. Las diferencias entre los distintos grupos en cuanto a la sensibilidad mostrada se evaluaron estadísticamente mediante el test chi-cuadrado (tabla 15).

La sensibilidad del ELISA con el LH como antígeno se mostró afectado por un mayor número de variables que los antígenos recombinantes, incluyendo el número de quistes, su localización y clasificación además de antecedentes de hidatidosis, complicaciones y el momento de colección del suero antes o después de un tratamiento. Así mismo, los resultados obtenidos con el kit de HAI estuvieron afectados por todas las variables excepto por antecedentes de quiste hidatídico en los pacientes. La sensibilidad del test con el antígeno B2t fue afectado por el número de quistes y por la fecha de recogida del suero de modo que los pacientes con un único quiste fueron con mayor frecuencia negativos que cuando los pacientes presentaban varios quistes y de igual manera, los sueros que fueron tomados tras un tratamiento estuvieron asociados con un incremento en la probabilidad de presentar un resultado positivo con el ELISA-B2t. El resultado de la proteína recombinante 2B2t fue solamente afectado por una variable (el número de quistes), mostrando un menor número de resultados positivos en pacientes con un único quiste que en aquellos con

más de uno ( $P < 0,05$ ). El momento de la colección del suero, antes o después de un tratamiento, que afectó al resultado del ELISA con el antígeno B2t, no afectó al desarrollo del mismo test con el antígeno 2B2t. Sin embargo, la influencia de otros tratamientos, ya que en este caso la gran mayoría se referían a tratamiento quirúrgico, debería ser evaluado, pero en general, el mayor número de sueros positivos en todos los grupos se dio con el antígeno 2B2t.

La influencia del tipo de complicación en los quistes fue también estudiada dividiendo este grupo en dos subgrupos, ruptura del quiste y quistes infectados. Entre los 98 pacientes con complicaciones, 51 (52%) tenían un quiste roto y 47 (48%) tenían quistes infectados. La diferencia entre el número de positivos resultantes entre los dos subgrupos no fue estadísticamente significativa para ninguno de los antígenos testados.

**Tabla 15.** Variabilidad de la sensibilidad diagnóstica del líquido hidatídico (LH) y los antígenos recombinantes B2t y 2B2t en ELISA, y de un kit comercial de HAI según las características clínicas de los pacientes (chi-cuadrado).

	ELISA-LH		ELISA-B2t		ELISA-2B2t		HAI	
	Positivos	P	Positivos	P	Positivos	P	Positivos	P
NÚMERO DE QUISTES	Único (108)	85 (78,7%)	78 (72,2%)	0,007	90 (83,3%)	0,036	26 (24,1%)	0,000
	Múltiple (78)	70 (89,7%)	69 (88,5%)		73 (93,6%)		39 (50,0%)	
LOCALIZACIÓN QUÍSTICA	Hígado (65)	48 (73,8%)	49 (75,4%)	0,716	57 (87,7%)	0,385	11 (16,9%)	0,002
	Pulmón (86)	74 (86,0%)	67 (77,9%)		71 (82,5%)		35 (40,7%)	
CLASIFICACIÓN OMS*	CE1 (44)	29 (65,9%)	31 (70,4%)	0,078	39 (88,6%)	1,000	6 (13,6%)	0,032
	CE2 a CE4 (32)	29 (90,6%)	28 (87,5%)		29 (90,6%)		11 (34,4%)	
COMPLICACIONES	No (87)	65 (74,7%)	65 (74,7%)	0,186	74 (85,0%)	0,330	18 (20,7%)	0,000
	Sí (98)	89 (90,8%)	81 (82,6%)		88 (89,8%)		46 (46,9%)	
ANTECEDENTES	Sí (20)	20 (100%)	17 (85,0%)	0,771	19 (95,0%)	0,476	10 (50,0%)	0,135
	No (166)	135 (81,3%)	130 (78,3)		144 (86,7%)		55 (33,1%)	
COLECTA DEL SUERO	Antes tr. (129)	100 (77,5%)	96 (74,4%)	0,020	111 (86,0%)	0,322	35 (27,1%)	0,001
	Después tr. (57)	55 (96,5%)	51 (89,5%)		52 (91,2%)		30 (52,6%)	

Las diferencias se consideran significativas cuando  $P < 0,050$  (en negrita). Los resultados son mostrados como número de sueros positivos frente a los diferentes antígenos, y como porcentajes de sensibilidad entre paréntesis. El número de sueros por grupo se muestra entre paréntesis. \* calculado solo para quistes en el hígado. Antes tr., sueros tomados antes del tratamiento; Después tr., sueros tomados después del tratamiento.

Mediante un análisis de regresión logística binaria bivariante se calcularon los valores de odds ratio (OR) para cada característica clínica, y con un análisis de regresión logística binaria multivariante se analizaron en conjunto aquellas que mostraron ser las más influyentes en el resultado de los tests de inmunodiagnóstico (tabla 16).

Según los resultados del análisis bivariado, el test de HAI es el afectado por un mayor número de variables incluyendo la presencia de más de un quiste, de complicaciones, de quistes en pulmón, y sueros recogidos tras el tratamiento que fueron asociados a una mayor probabilidad de resultado positivo con dicho test. Esta mayor probabilidad de resultado positivo fue también observada en el análisis multivariado ( $P < 0.05$ ; tabla 16).

Para el caso del ELISA-LH, cuando los quistes fueron clasificados entre las categorías CE2 a CE4, con complicaciones y cuando el suero fue tomado tras un tratamiento hubo una mayor probabilidad de obtener un resultado positivo. Estas asociaciones se mantuvieron en el análisis multivariado ( $P < 0.05$ ; tabla 16).

Con respecto a los antígenos recombinantes, una mayor probabilidad de resultado positivo se dio ante la presencia de más de un quiste (para B2t y 2B2t) y cuando el suero fue colectado tras un tratamiento (para B2t; tabla 16). Sin embargo, la presencia de varios quistes fue la única variable estadísticamente significativa en el análisis multivariado para B2t ( $P < 0.05$ ), no siendo así para el factor de que los sueros fueran tomados antes de un tratamiento ( $P = 0,053$ ). En el caso del ELISA-2B2t, la presencia de múltiples quistes no estuvo asociado con una mayor probabilidad de resultados positivos ( $P = 0,064$ ).

**Tabla 16.** Valores de OR (odds ratio) para la positividad de los tests según características clínicas de los pacientes (regresión logística).

	ELISA-LH		ELISA-B2t		ELISA-2B2t		HAI	
	B-OR (IC)	M-OR (IC)	B-OR (IC)	M-OR (IC)	B-OR (IC)	M-OR (IC)	B-OR (IC)	M-OR (IC)
<b>NÚMERO DE QUISTES</b>	1	--	1	1	1	1	1	1
	2,4 (1,0-5,6)	--	2,9 (1,3-6,6)	2,7 (1,2-6,2)	2,9 (1,0-8,2)	2,7 (0,9-7,7)	3,1 (1,7-5,9)	3,0 (1,5-5,9)
<b>LOCALIZACIÓN QUIÍSTICA</b>	1	--	1	--	1	--	1	1
	2,2 (1,0-5,0)	--	1,1 (0,5-2,5)	--	0,6 (0,3-1,7)	--	3,4 (1,5-7,3)	2,7 (1,1-6,8)
<b>CLASIFICACIÓN OMS*</b>	1	1	1	--	1	--	1	--
	4,0 (1,0-15,5)	6,6 (1,1-38,5)	2,2 (0,6-8,0)	--	1,0 (0,2-4,8)	--	2,2 (0,6-8,2)	--
<b>COMPLICACIONES</b>	1	1	1	--	1	--	1	1
	3,3 (1,4-7,7)	2,4 (1,0-5,8)	1,6 (0,8-3,3)	--	1,5 (0,6-3,7)	--	3,4 (1,8-6,5)	2,9 (1,5-5,9)
<b>ANTECEDENTES</b>	1	--	1	--	1	--	1	--
	3,7 (0,0)	--	1,6 (0,4-5,6)	--	2,9 (0,4-22,8)	--	2,0 (0,8-5,1)	--
<b>COLECTA DEL SUERO</b>	1	1	1	1	1	--	1	1
	8,0 (1,8-34,7)	6,6 (1,5-29,1)	2,9 (1,1-7,4)	2,6 (1,0-6,7)	1,7 (0,6-4,8)	--	3,0 (1,6-5,7)	2,6 (1,3-5,1)

La asociación e influencia de las variables clínicas, enumeradas en la primera columna, en la sensibilidad del líquido hidatídico (LH), B2t y 2B2t-ELISAs y de un kit comercial de HAI fueron estadísticamente evaluadas. B-OR: odds ratio en el análisis de regresión bivariado, y M-OR en el multivariado. IC: 95% intervalo de confianza. Diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,050$ ) se muestran en negrita. Tr: tratamiento.



Puesto que el antígeno recombinante 2B2t mostró mayor eficiencia diagnóstica en cuanto a las sumas de sensibilidad y especificidad con donantes, y se mostró como el test menos influenciado por las variables clínicas estudiadas que cualquiera de los otros tests investigados aquí con los sueros testados hasta ese momento, incluyendo un test comercial, se decidió patentar este nuevo antígeno recombinante. El documento de solicitud de esta patente se añade en el anexo dedicado a las publicaciones derivadas de los resultados obtenidos en esta Tesis, puesto que se considera también producción de la misma.

En este primer ensayo acerca de las características clínicas que podían afectar a su sensibilidad algunos de los grupos que fueron comparados presentaron un número muy limitado de sueros. Se seleccionaron para ampliar este estudio 946 sueros de pacientes con hidatidosis confirmada, recogidos en hospitales de Italia y Alemania, que a priori se habían colectado para estudios de seguimiento serológico, pero que permitieron en algunos casos añadir información acerca de la influencia de las variables clínicas conocidas para este grupo de sueros en la utilidad diagnóstica (sensibilidad) del antígeno recombinante 2B2t, en comparación con el B2t y el LH en ELISA. Estas variables fueron: número de quistes (único o múltiples), localización quística (hígado y otras), clasificación de la OMS (quistes activos y transicionales -CE1, 2 y 3-, y quistes inactivos -CE4 y 5), y toma de suero antes o después del tratamiento. Los subgrupos que acabamos de mencionar se construyeron así para tener un número representativo de sueros en cada uno de ellos. Estos sueros fueron seleccionados de 1.245 sueros totales, excluyendo aquellos que correspondían a pacientes sin quistes tras intervención.

Estos 946 sueros de Italia y Alemania, junto con los 186 sueros de los pacientes de Perú, se utilizaron para comparar la influencia de las distintas variables clínicas sobre el resultado de la serología mediante el test chi-cuadrado (tabla 17). Posteriormente, se realizó un análisis de regresión logística binaria bivariante y multivariante para el cálculo de los valores de odds ratio (tabla 18).

Para los tres antígenos ensayados la sensibilidad obtenida fue estadísticamente diferente según el número de quistes, el tipo de quiste de acuerdo a su actividad, y el momento de recogida del suero con respecto a la fecha de

tratamiento. La sensibilidad obtenida con los recombinantes estuvo también influida por la localización del quiste, siendo mayor cuando este se encontraba en un órgano diferente al hígado (tabla 17).

Los valores de OR obtenidos mediante la regresión logística bivariada muestran una mayor probabilidad de obtener un resultado positivo en ELISA con LH, B2t y 2B2t cuando el paciente muestra quistes múltiples, en estado activo (CE1, CE2, CE3a y CE3b), cuando el suero es recogido tras el tratamiento, y cuando se encuentra en un órgano diferente al hígado para el caso del B2t y 2B2t (tabla 18). Tras el análisis por regresión logística multivariada se demuestra sin embargo, que la localización quística no influye en el resultado del test con ninguno de los antígenos y que las otras tres variables mencionadas influyen directamente en el resultado de estas técnicas serodiagnósticas (tabla 18).

En el análisis multivariado, los factores más influyentes para cada uno de los antígenos fueron: para el LH, el momento de la recogida del suero con respecto al inicio del tratamiento, y para ambos antígenos recombinantes, la actividad quística (tabla 18).

**Tabla 17.** Comparación de la sensibilidad obtenida para cada característica clínica del ELISA-IgG con LH y los recombinantes B2t y 2B2t.

	ELISA-LH		ELISA-B2t		ELISA-2B2t	
	Positivos	P	Positivos	P	Positivos	P
<b>NÚMERO DE QUISTES</b>	Único (662)	551 (83,2%)	300 (45,3%)	0,000	329 (49,7%)	0,000
	Múltiple (464)	439 (94,6%)	319 (68,7%)		328 (70,7%)	
<b>LOCALIZACIÓN QUIÍSTICA</b>	Hígado (942)	827 (87,8%)	487 (51,7%)	0,000	512 (54,3%)	0,000
	Otras (162)	141 (87,5%)	111 (68,5%)		122 (75,3%)	
<b>CLASIFICACIÓN OMS</b>	CE1+2+3 (630)	598 (95%)	427 (67,8%)	0,000	465 (73,8%)	0,000
	CE4+5 (400)	308 (77%)	114 (28,5%)		110 (27,5%)	
<b>COLECTA DEL SUERO</b>	Antes tr. (661)	533 (80,6%)	299 (45,2%)	0,000	320 (48,4%)	0,000
	Después tr. (458)	450 (98,2%)	316 (69%)		333 (72,7%)	

Las diferencias se consideran significativas a valores de  $P < 0.050$  (en negrita). Los resultados son mostrados como número de sueros positivos contra los diferentes antígenos y como porcentajes de sensibilidad entre paréntesis. El número de sueros por grupo se muestra entre paréntesis.

**Tabla 18.** Valores de OR (odds ratio) para la positividad de los tests según características clínicas de los pacientes (regresión logística).

	ELISA-LH		ELISA-B2t		ELISA-2B2t	
	B-OR (IC)	M-OR (IC)	B-OR (IC)	M-OR (IC)	B-OR (IC)	M-OR (IC)
<b>NÚMERO DE QUISTES</b>	1	1	1	1	1	1
	3,5 (2,2-5,5)	3,1 (1,9-5,1)	2,6 (2,1-3,4)	2,5 (1,9-3,3)	2,4 (1,9-3,1)	2,2 (1,6-2,9)
<b>LOCALIZACIÓN QUIÍSTICA</b>	1	--	1	--	1	--
	0,97 (0,6-1,6)	--	2,03 (1,4-2,9)	--	2,6 (1,7-3,7)	--
<b>CLASIFICACIÓN OMS</b>	1	1	1	1	1	1
	5,7 (3,7-8,7)	3,9 (2,5-6,1)	5,3 (4-6,9)	4,5 (3,4-6,01)	7,4 (5,6-9,8)	6,4 (4,7-8,5)
<b>COLECTA DEL SUERO</b>	1	1	1	1	1	1
	13,3 (6,5-27,6)	10,2 (4,6-22,4)	2,7 (2,1-3,5)	2,2 (1,6-2,9)	2,8 (2,2-3,7)	2,3 (1,7-3,1)

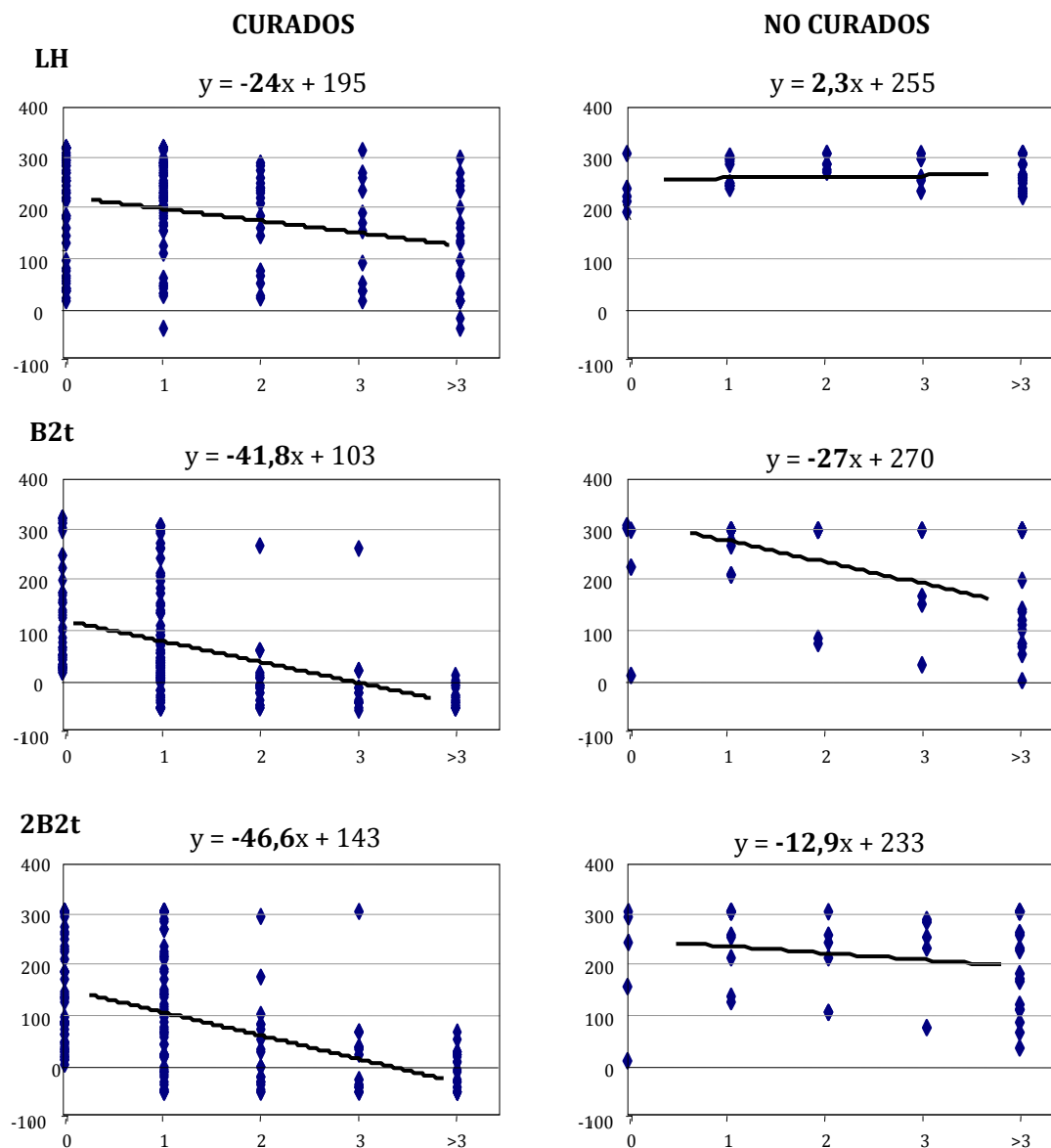
La asociación e influencia de las variables clínicas enumeradas en la primera columna en la sensibilidad del líquido hidatídico (LH), B2t y 2B2t en ELISA fueron estadísticamente evaluadas. B-OR: odds ratio en el análisis de regresión bivariado, y M-OR en el multivariado. IC: 95% intervalo de confianza. Diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.050$ ) se muestran en negrita. Tr: tratamiento.

### 5.3. SEGUIMIENTO SEROLÓGICO DE PACIENTES CON HIDATIDOSIS

#### 5.3.1. SEGUIMIENTO TRAS CIRUGÍA O UNA TÉCNICA DE ASPIRACIÓN

En cuanto al seguimiento postquirúrgico, se seleccionaron 71 pacientes que fueron sometidos a cirugía o a una técnica de aspiración. Para esta selección se tuvo en cuenta que el primer suero disponible de cada paciente tuviera un valor positivo en ELISA para todos los antígenos, lo que hace posible la comparación en conjunto de la evolución serológica de este grupo de pacientes. De los 71, 60 pacientes fueron clasificados como curados y 11 como no curados. Los resultados de IS de los sueros de cada uno de los grupos de pacientes para cada antígeno en ELISA aparecen representados en la figura 21, en la que se representa este índice tras restarle el valor de corte correspondiente (50), de modo que los sueros con valores  $\geq 0$  se consideran positivos y los sueros con valores  $< 0$  son negativos. También se representa la recta que indicaría la tendencia de los valores de IS a lo largo del período de seguimiento.

Tras comprobar que los valores de IS no seguían una distribución normal, a la hora de hacer comparaciones entre grupos se optó por el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. La prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes determinó que no existían diferencias significativas entre los intervalos de tiempo en el grupo de los no curados, siendo así para todos los antígenos (tabla 19). Sin embargo, para el caso de los pacientes curados los valores de IS no fueron iguales entre los distintos intervalos de tiempo para ninguno de los antígenos (tabla 19).



**Figura 21.** Seguimiento de pacientes curados y no curados tras intervención quirúrgica o aspiración. Cada punto representa el valor IS-50 obtenido por cada uno de los sueros en los intervalos de tiempo indicados. El valor de corte para discriminar entre valores positivos y negativos es 0. IS, índice serológico; T, tiempo transcurrido desde la intervención, donde 0 indica antes o inmediatamente después de la intervención, 1, 2 y 3 indican los sueros recogidos durante el primero, segundo y tercer año tras el tratamiento, y >3, indica los sueros recogidos con posterioridad a los 3 años del tratamiento, llegando a los 11 años. En negrita se señalan las pendientes de cada una de las líneas de tendencia.

**Tabla 19.** Comparación de los valores de IS entre los distintos intervalos de tiempo dentro de cada grupo, curados y no curados, para cada antígeno, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.

	CURADOS	NO CURADOS
LH	0,002	0,103
B2t	0,000	0,195
2B2t	0,000	0,408

La hipótesis planteada es: la distribución de los valores de IS es la misma en todos los intervalos de tiempo. Se dan los valores de  $P$  para cada antígeno, para pacientes curados y no curados. Cuando  $P < 0,050$ , la distribución de los valores es diferente.

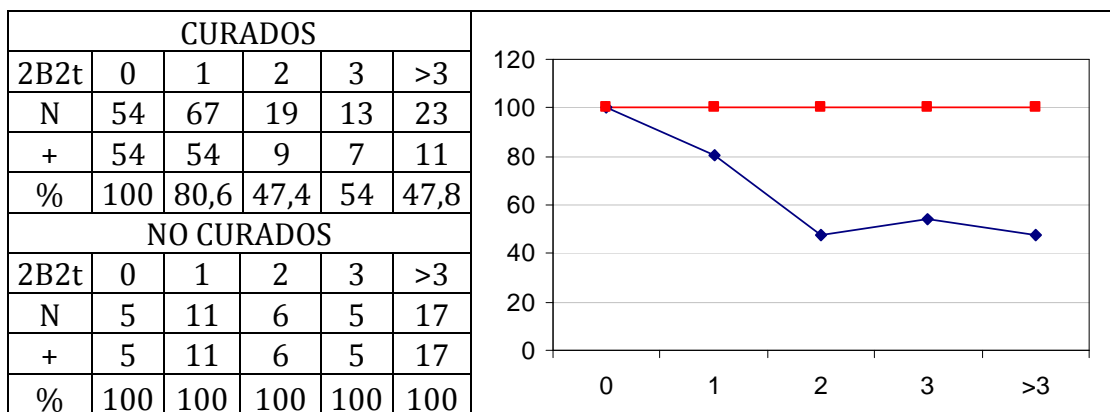
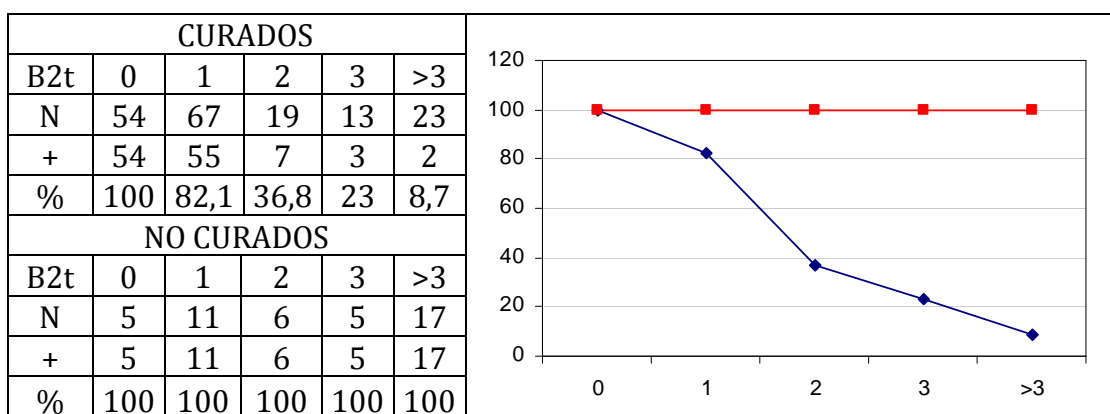
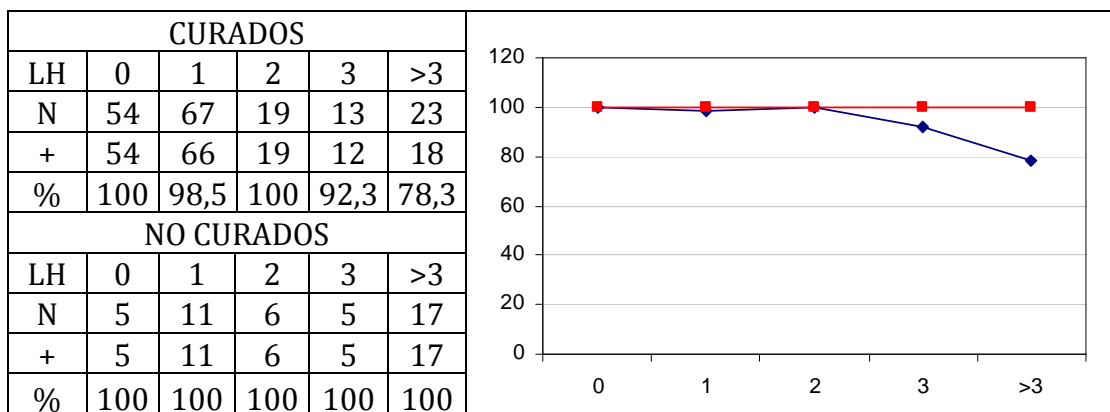
Para ver la tendencia de cada uno de los tests serológicos con cada uno de los grupos de pacientes, se hizo un recuento de los sueros positivos en cada punto de tiempo para calcular el porcentaje (figura 22).

Con el grupo de pacientes curados, la tendencia observada con el LH es una disminución del IS con el tiempo, aunque pocos son los sueros que se llegan a negativizar tras más de 3 años de la intervención (25%). En el grupo de pacientes no curados todos los sueros se mantuvieron positivos hasta el momento final del seguimiento.

Con los recombinantes, todos los sueros de pacientes no curados mantienen valores positivos de IS a lo largo del seguimiento, mientras que en el caso de los curados se observa una disminución del IS, con la negativización de muchos de los sueros.

En el ELISA con el recombinante B2t se da una fuerte caída de la positividad comprendida entre 1-2 años tras la curación. En el punto final de este seguimiento, solo el 8,7% de los sueros fueron positivos. (figura 22).

En el ELISA con el recombinante 2B2t la mayor caída de porcentaje de positividad también aparece comprendida en el período 1-2 años tras la curación. En el punto final del seguimiento, el 47,8% de los sueros siguieron siendo positivos.



—◆— CURADOS      —■— NO CURADOS

**Figura 22.** Diferencias observadas entre el grupo de pacientes curados y el de no curados respecto al porcentaje de sueros positivos por intervalo de tiempo para cada test diagnóstico. En las tablas aparece el número de sueros correspondiente a cada intervalo de tiempo (N), el número de sueros positivos (+) y el porcentaje de positivos en cada momento de toma de los sueros (%). Las gráficas representan el porcentaje (eje Y) de sueros positivos con respecto al tiempo (eje X).



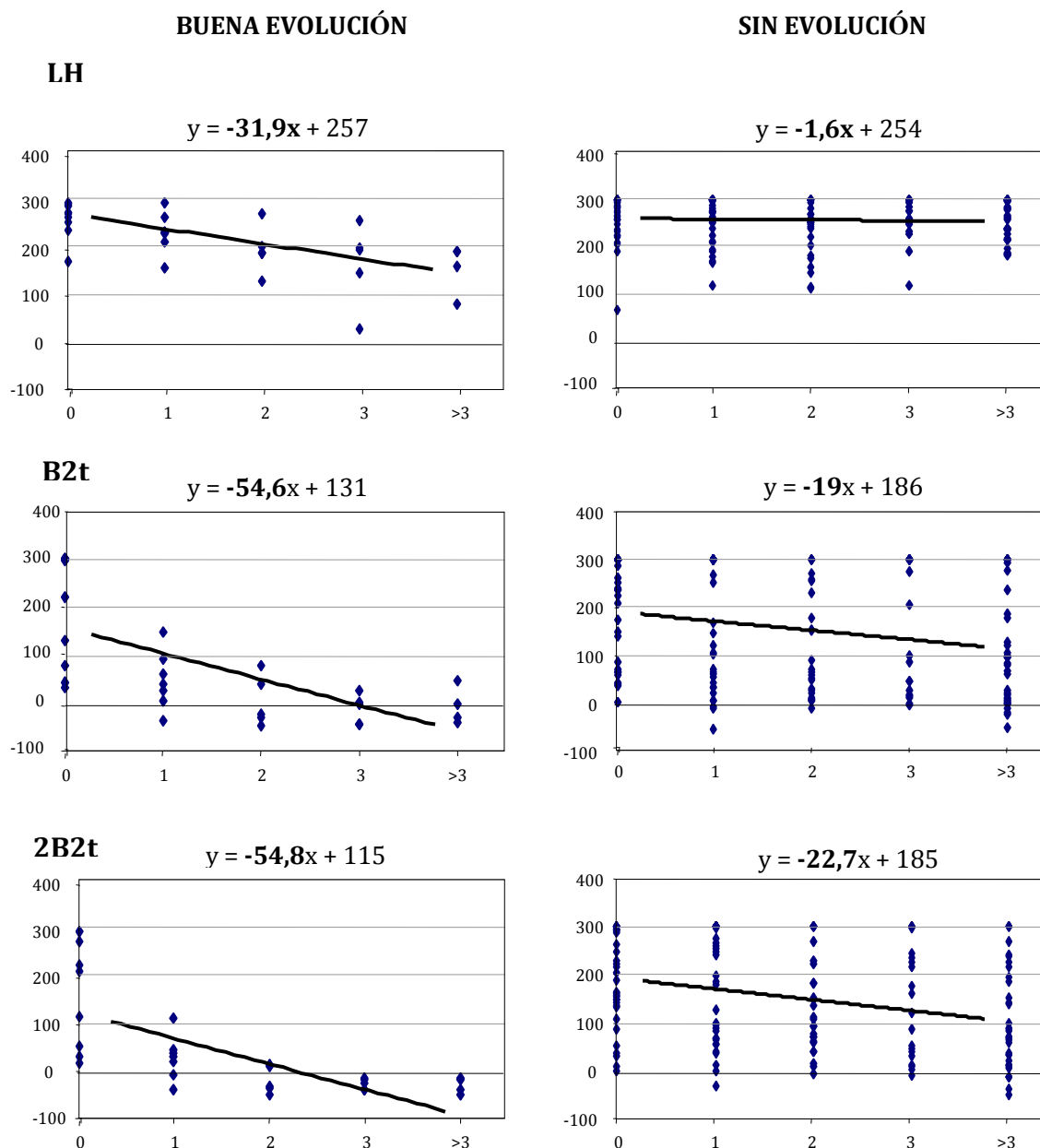
### 5.3.2. SEGUIMIENTO TRAS UN TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

Para el estudio de pacientes en seguimiento tras un tratamiento farmacológico, se seleccionaron 178 sueros de 44 pacientes que habían recibido albendazol y no habían sido sometidos a cirugía o aspiración.

Los pacientes con tratamiento farmacológico se subdividieron en dos grupos, tal y como se menciona en Materiales y Métodos, con buena evolución y sin evolución. En estos dos grupos, se realizó una comparación de los índices serológicos frente a cada uno de los antígenos testados, a lo largo del tiempo tras tratamiento. De los 44 pacientes, 7 (30 sueros) fueron clasificados en el grupo con buena evolución tras el tratamiento y 37 (148 sueros) en el grupo que no presentó evolución. En este último grupo, se encontraron tres pacientes con quistes que evolucionaron desde transicionales a inactivos (CE4), según la técnica de imagen, y posteriormente experimentaron una regresión a quistes transicionales después de la finalización del tratamiento. Estos tres pacientes presentaron durante todo el seguimiento serología positiva frente a los tres antígenos testados.

Los resultados del IS-50 de los sueros de cada uno de los grupos de pacientes para cada antígeno en ELISA aparecen representados en la figura 23 acompañados de la recta que indicaría la tendencia de los valores de IS a lo largo del período de seguimiento.

Tras comprobar que los valores de IS no seguían una distribución normal, a la hora de hacer comparaciones entre grupos se optó por el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (tabla 20). La prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes determinó que la distribución de los valores de IS dentro del grupo de pacientes con buena evolución no era igual para todos los intervalos de tiempo con cada uno de los antígenos en ELISA encontrándose diferencias significativas. En el caso de los pacientes sin evolución, con LH no se encontraron diferencias significativas entre los intervalos de tiempo. Sin embargo, con este mismo grupo de pacientes aparecieron diferencias significativas en la distribución de los valores de IS obtenidos con los recombinantes para cada intervalo de tiempo.



**Figura 23.** Seguimiento de pacientes tras tratamiento farmacológico. Cada punto representa el valor de IS-50 obtenido por un suero en el tiempo indicado tras el tratamiento. El valor de corte para discriminar entre valores positivos y negativos es 0. Eje Y, índice serológico-50; eje X, tiempo transcurrido desde el tratamiento, donde 0 indica antes o justo al finalizar el último ciclo de tratamiento, 1, 2 y 3 indican los sueros recogidos durante el primero, segundo y tercer año tras el tratamiento, y >3, indica los sueros recogidos con posterioridad a los 3 años del tratamiento llegando a los 7 años. En negrita se señalan las pendientes de cada una de las líneas de tendencia.

**Tabla 20.** Comparación de los valores de IS entre los distintos intervalos de tiempo dentro de cada grupo, los que presentan buena evolución y los que no muestran evolución, para cada antígeno, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.

	BUENA EVOLUCIÓN	SIN EVOLUCIÓN
LH	0,013	0,284
B2t	0,003	0,050
2B2t	0,001	0,031

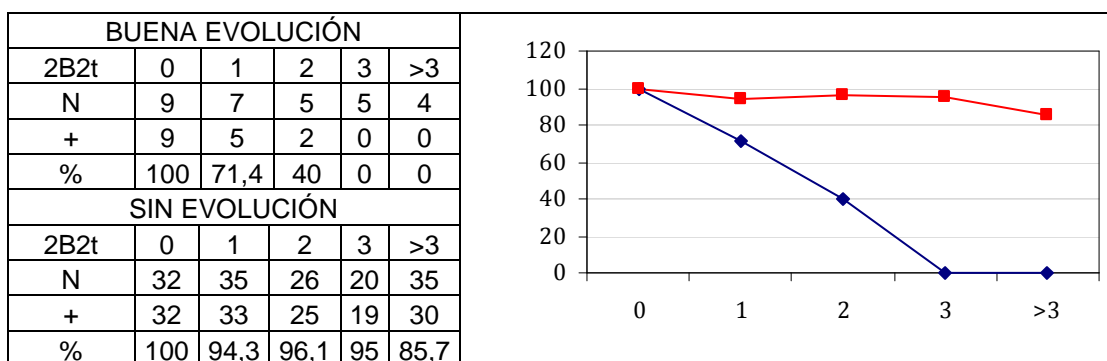
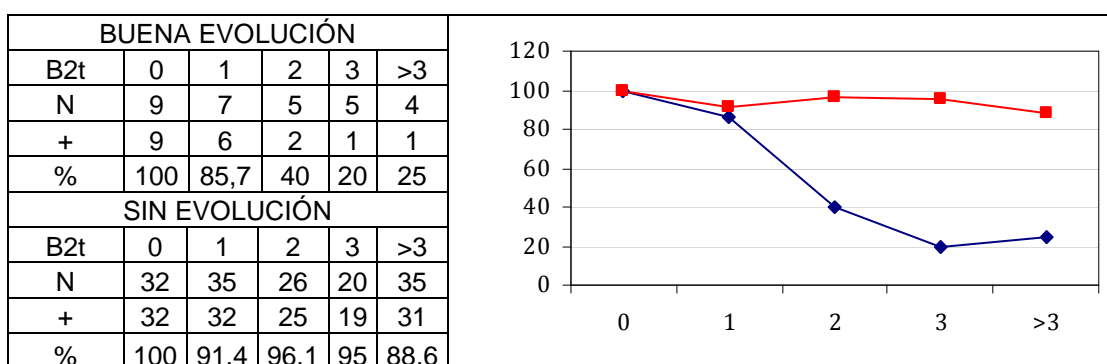
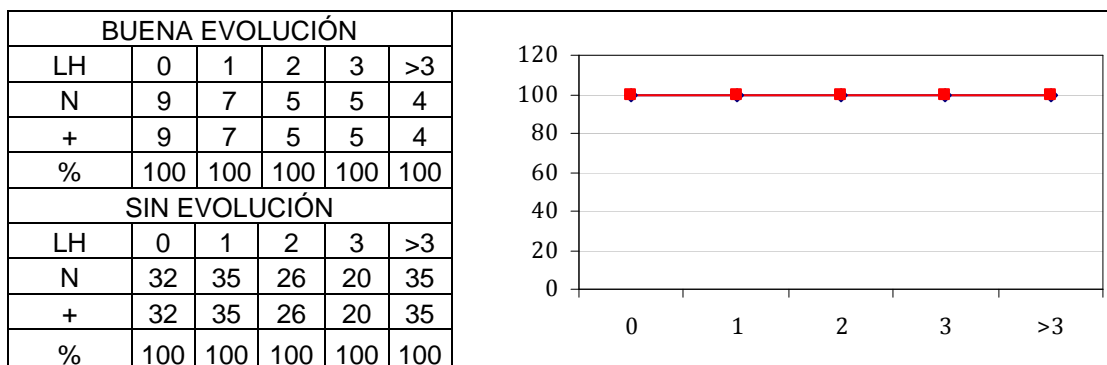
La hipótesis planteada es: la distribución de los valores de IS es la misma en todos los intervalos de tiempo. Se dan los valores de  $P$  para cada antígeno, para pacientes curados y no curados. Cuando  $P < 0,050$ , la distribución de los valores es diferente.

Para ver la tendencia de la serología frente a cada antígeno en ELISA, en pacientes con buena evolución y sin evolución, se realizó un recuento del número de sueros positivos en cada intervalo de tiempo, y se calculó el porcentaje de positividad para cada intervalo (figura 24).

Con el LH no se observó ninguna diferencia en el porcentaje de positivos entre los dos grupos en ningún momento tras el tratamiento, siendo todos los sueros siempre positivos.

El antígeno recombinante B2t mostró una brusca bajada del porcentaje de positivos con los pacientes con buena evolución tras el primer año. El porcentaje obtenido con los sueros de aquellos pacientes que no mejoraron disminuye levemente cuando los sueros han sido tomados más de 3 años después del tratamiento.

Con el antígeno 2B2t se observó una disminución del número de positivos desde el primer intervalo de tiempo, hasta llegar al 0% de pacientes positivos en el período comprendido entre 2 y 3 años tras el tratamiento en pacientes con buena evolución. Los sueros de pacientes sin evolución también muestran una ligera bajada de IS a partir de los tres años de seguimiento.



—◆— EVOLUCIÓN      —■— SIN EVOLUCIÓN

**Figura 24.** Diferencias observadas entre el grupo de pacientes con buena evolución y sin evolución, respecto al porcentaje de sueros positivos por intervalo de tiempo para cada test diagnóstico. En las tablas aparecen el número de sueros correspondiente a cada intervalo de tiempo (N), el número de sueros positivos (+) y el porcentaje de positivos en cada momento de toma de los sueros (%). Las gráficas representan el porcentaje (eje Y) de sueros positivos con respecto al tiempo (eje X).

### 5.3.3. SEGUIMIENTO DE PACIENTES EN *WATCH AND WAIT*

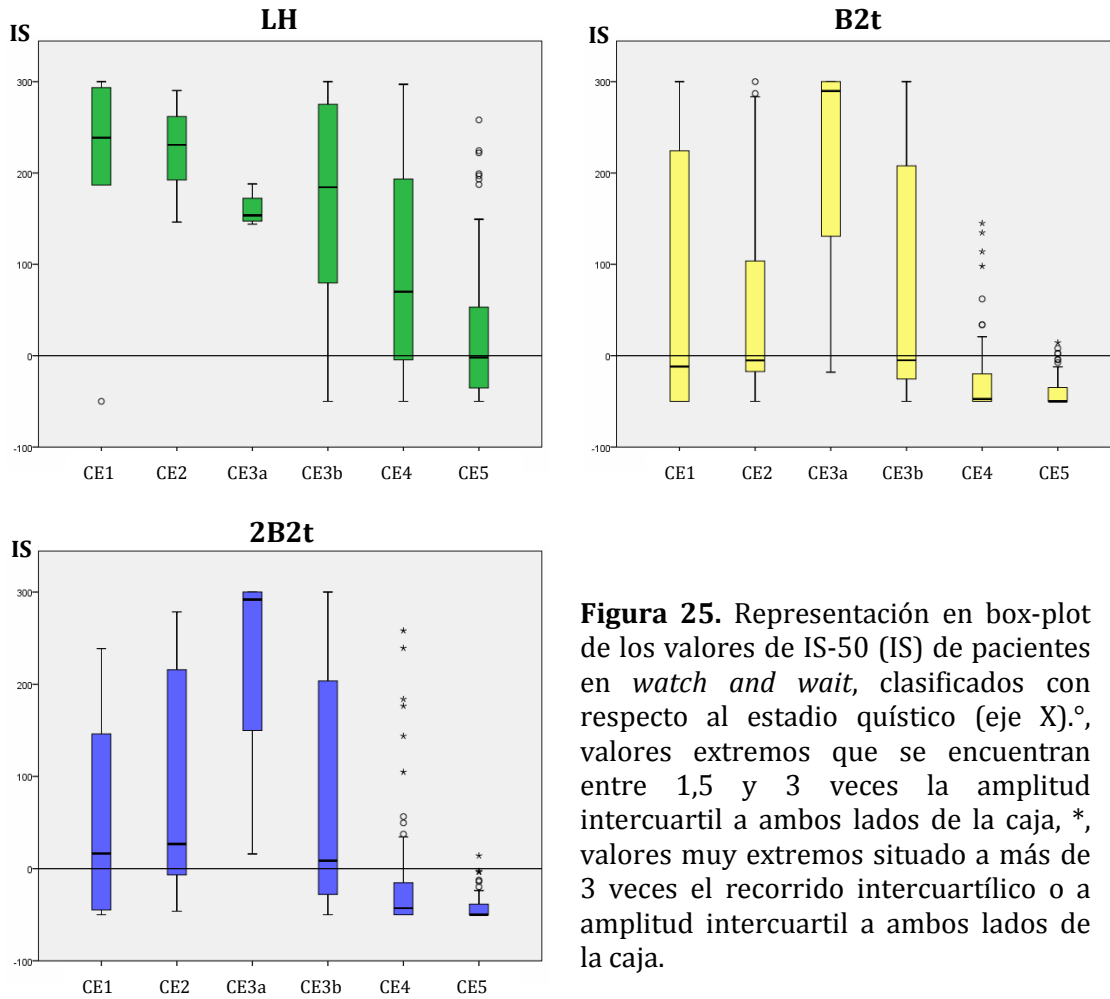
Se seleccionaron un total de 236 sueros de 116 pacientes que nunca habían sido tratados ni con cirugía ni con fármacos durante el tiempo de seguimiento que se incluye en este estudio.

Para este tipo de pacientes se pretendía ver la existencia de concordancia entre el resultado serológico con el estadio del quiste, sin la influencia de un tratamiento previo que pueda afectar a la sensibilidad de la técnica.

Para ello los sueros fueron divididos según la imagen aportada en las distintas categorías de quiste del siguiente modo, 6 CE1, 15 CE2, 4 CE3a, 32 CE3b, 85 CE4 y 94 CE5. La mayoría de los pacientes presentaron, desde el inicio del seguimiento, lesiones inactivas. Solo dos de los pacientes en *watch and wait* pasaron de quistes activos a inactivos durante el periodo de seguimiento. Estos dos pacientes mostraron serologías negativas frente a todos los antígenos testados durante todo el seguimiento, por lo que la evolución positiva no se tradujo en una negativización del IS.

Los valores de IS-50 obtenidos tras el ELISA con cada uno de los antígenos fueron representados en diagramas tipo box plot, observándose que la distribución de dichos valores en las distintas categorías no seguían una normal (figura 25).

Ya que los datos no seguían una normal y que además estas distribuciones eran muy diferentes entre sí, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, cuyo resultado coincide con esta observación, mostrando que los IS no son iguales entre los distintos subgrupos para ninguno de los antígenos (tabla 20.A).



**Figura 25.** Representación en box-plot de los valores de IS-50 (IS) de pacientes en *watch and wait*, clasificados con respecto al estadio quístico (eje X).°, valores extremos que se encuentran entre 1,5 y 3 veces la amplitud intercuartil a ambos lados de la caja, \*, valores muy extremos situado a más de 3 veces el recorrido intercuartilico o a amplitud intercuartil a ambos lados de la caja.

En general, para los tres antígenos se observa un descenso en los valores de IS para los quistes CE4 y CE5, de modo que para los dos recombinantes, casi la totalidad de los sueros de estos dos subgrupos se encuentran por debajo del valor de corte 0, mostrando además valores muy próximos entre sí, es decir, poca variabilidad. Con el LH también se observan valores menores de IS para quistes inactivos, pero esta tendencia es mucho menos evidente ya que para quistes CE4 el recorrido intercuartílico es muy amplio con gran variabilidad en los resultados y aún se observan sueros con IS muy elevados, aunque en menor proporción que en estadios más activos del quiste. En cuanto al resto de los quistes con el LH, todos ellos presentan una mediana similar y valores de IS muy elevados, excepto en el caso de quistes CE3b, con un recorrido intercuartílico muy amplio, que incluye valores negativos. Con los recombinantes, los quistes CE3a aparecen como los más inmunoreactivos, con un mayor número de sueros con IS muy altos. Para el resto,

CE1, CE2 y CE3b, se muestran recorridos intercuartílicos muy amplios, estando la mediana cercana o por debajo del nivel 0.

Viendo estos resultados parece que las principales variaciones en la serología coinciden con la actividad del quiste y dado que el número de sueros con quistes activos y transicionales eran muy pocos, se optó por agruparlos en dos categorías: “quistes activos” (CE1, CE2 y CE3) y “quistes inactivos” (CE4 y CE5). Mediante la prueba de U de Mann-Whitney se determinó que existían diferencias entre estos dos grupos (tabla 20.B).

**Tabla 20.** Determinación de diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los valores de IS según el estadio quístico con cada uno de los antígenos en ELISA.

**A.** Comparación de la distribución de los valores de IS entre los diferentes estadios quísticos para cada antígeno

KRUSKAL-WALLIS	
	<i>P</i>
LH	0,000
B2t	0,000
2B2t	0,000

**B.** Comparación de la distribución de los valores de IS entre quistes activos+transicionales (CE1+2+3) y quistes inactivos (CE4+5).

U DE MANN-WHITNEY	
	<i>P</i>
LH	0,000
B2t	0,000
2B2t	0,000

Valores de  $P < 0,05$  indican diferencias significativas en ambos tests estadísticos.

Mediante el recuento del número de sueros positivos y negativos con cada antígeno, se calculó el porcentaje de positividad obtenida para cada tipo de quiste (tabla 21A) representado en la figura 26A. El porcentaje de pacientes positivos tiende a disminuir con la pérdida de actividad de los quistes con los tres antígenos. Entre el recombinante B2t y 2B2t, este último presenta una mayor caída de este valor con los quistes inactivos, pasando así de un valor medio de 61% de positividad para quistes activos y transicionales, a una media de 9,5 % para quistes inactivos mientras que el B2t baja del 49,1% para quistes activos y transicionales a una media de 10,6% para los inactivos.

Con fines comparativos, se representó también de forma similar un grupo de 264 sueros de pacientes que habían sido tratados con albendazol (tabla 21B y figura 26B) comparándose la positividad mostrada entre los distintos estadios quísticos.

Al comparar cada uno de los subgrupos (CE1 a CE5) entre los pacientes *watch and wait* y los tratados farmacológicamente se comprueba que los porcentajes de positividad para los CE1 y CE2 con el antígeno B2t son mucho más bajos en pacientes no tratados que en tratados (33 y 47% vs. 89 y 69%, respectivamente; figura 26). Estas diferencias son mucho menores en el caso del antígeno 2B2t y menores aún para el LH, que detecta un 83% de pacientes CE1 sin tratar y un 100% en el caso de los tratados. Para pacientes con quistes CE3a, los porcentajes son similares en pacientes no tratados y tratados. Para el resto de los grupos se detecta una bajada de anticuerpos para ambos tipos de pacientes, más acentuada en el caso de los antígenos recombinantes, con valores próximos al 0% en pacientes *watch and wait* con quistes CE5.

**Tabla 21.** Porcentaje de positividad para cada estadio quístico en pacientes en seguimiento *watch and wait* y en pacientes que fueron sometidos a un tratamiento farmacológico en un período de tiempo no superior a dos años desde la recogida del suero.

**A. WATCH AND WAIT**

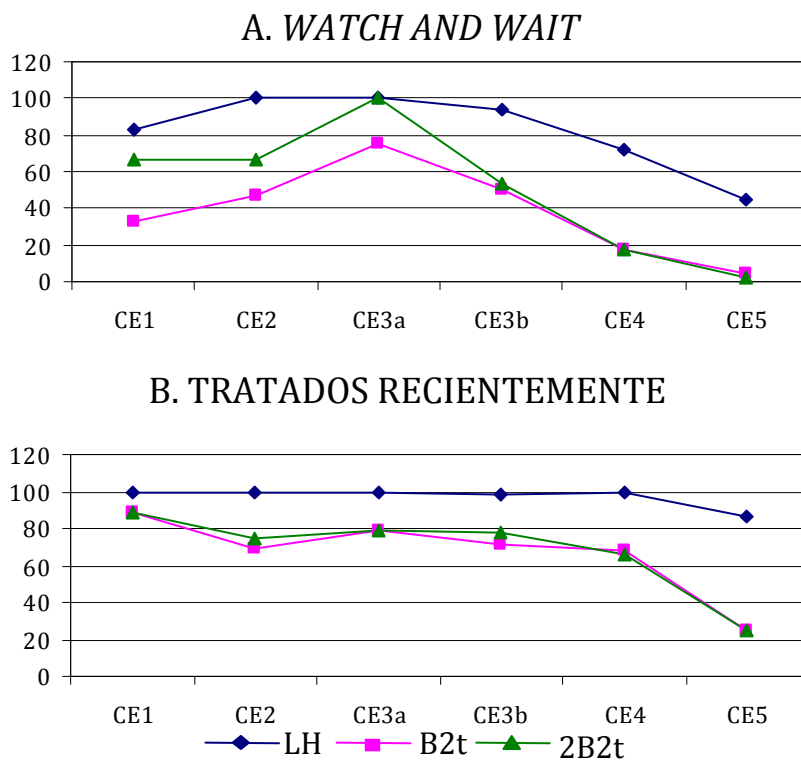
	N	LH	B2t	2B2t
<b>CE1</b>	6	83	33	67
<b>CE2</b>	15	100	47	67
<b>CE3a</b>	4	100	75	100
<b>CE3b</b>	32	94	50	53
<b>CE4</b>	85	72	18	18
<b>CE5</b>	94	45	4	2

**B. TRATADOS RECIENTEMENTE**

	N	LH	B2t	2B2t
<b>CE1</b>	9	100	89	89
<b>CE2</b>	16	100	69	75
<b>CE3a</b>	44	100	80	80
<b>CE3b</b>	131	98	71	78
<b>CE4</b>	56	100	68	66
<b>CE5</b>	8	87,5	25	25

Se indica el porcentaje de sueros positivos dentro de cada categoría quística para cada antígeno testado. N indica el número de sueros dentro de cada tipo quístico.





**Figura 26.** Representación de los porcentajes de positividad obtenidos para cada estadio quístico con cada uno de los antígenos en pacientes en *watch and wait* (A) y en pacientes tratados con albendazol recientemente (B). En el eje Y aparece el porcentaje de positividad y en el eje X cada estadio quístico.

## 5.4. TIRAS DE INMUNODIAGNÓSTICO

### 5.4.1. TIRAS INMUNOCROMATOGRÁFICAS PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS

#### 5.4.1.1. PRIMERA APROXIMACIÓN: DESARROLLO EN CERTEST SL

A partir de unas condiciones estándar en la tira utilizando el antígeno 2B2t, se fueron modificando distintos factores que podrían influir en la sensibilidad y especificidad del test. Las diferentes variaciones dieron los siguientes resultados.

##### 1. Combinaciones en línea de tira y en conjugado.

De todas las combinaciones ensayadas, la única con la que se consiguió la visualización de la línea test para muestras positivas, fue aquella en la que la anti-IgG total humana se depositaba en la membrana y el antígeno recombinante en las partículas de color.

Este fue por tanto el modelo elegido sobre el que después se introdujeron variaciones que se enumeran a continuación, con el fin de mejorar la sensibilidad.

##### 2. Anticuerpos

Hasta ahora la membrana había sido tapizada con un monoclonal anti-IgG humana total. Para comprobar si era posible aumentar la sensibilidad de la técnica con otros anticuerpos, se hicieron tiras que contenían diferentes sub-isotipos anti-IgG monoclonales (1 ,2, 3 y 4) y una anti-IgG total policlonal.

Con los sub-isotipos IgG1, IgG2 e IgG3 no se obtuvo ninguna señal en el test. Con la anti-IgG total policlonal la señal obtenida con el *pool* de sueros positivos fue menos intensa que la resultante al utilizar el correspondiente monoclonal. Los mejores resultados fueron los obtenidos al utilizar el sub-isotipo anti-IgG4 monoclonal, con mayor intensidad de las bandas y mayor rapidez en la visualización de las mismas. Este anti-anticuerpo fue ensayado a dos concentraciones diferentes (1 mg/ml y 2 mg/ml) sobre los distintos tipos de membrana, dando las dos concentraciones el mismo resultado en tiras de poro medio y grande, pero con intensidades de banda superiores para la concentración mayor en tiras con poros menores y superficie de unión a proteínas mayor, tal y como se esperaba.

### 3. Materiales

En cuanto a las fibras absorbentes, tras probar diferentes texturas se seleccionó la estándar con la que se comenzaron los experimentos, ya que presentaba un espesor óptimo que evitaba que la muestra quedase atrapada en este compartimento en exceso, permitiendo el paso de la mayor parte de las microesferas a la membrana. En cuanto a su longitud, para este formato de tira se mantuvo el original.

Se probaron 3 tipos de membrana que diferían en el tamaño de poro, lo que se traduce en la velocidad con que la muestra pasará a través de ella. Las membranas de poro más pequeño presentaron problemas en cuanto a la especificidad, con la aparición de falsos positivos y fondos sucios, por lo que se descartó su uso. Las membranas de poro más grande, tenían el problema contrario. Presentaban un fondo blanco tras la cromatografía pero bajaba mucho la sensibilidad de la técnica. Finalmente se seleccionó la membrana de poro de tamaño medio.

### 4. Conjugados

Se ensayaron diferentes tamaños de microesferas (200, 300, 400 y 600 nm) en combinación con membranas de distinto tamaño de poro.

Con las partículas más pequeñas apenas se observaba señal, igual que sucedía con las membranas de poro mayor. En ambos casos el flujo es muy rápido y las partículas son muy pequeñas con respecto al poro, por lo que son capaces de salir de esta red antes de ser captadas específicamente por las moléculas ancladas en la línea test.

En cuanto a las esferas de 600 nm, se obtuvieron falsos positivos en todos los casos, además de un fondo sucio teñido de rojo. Lo mismo sucedía al utilizar una membrana de poro más pequeño, porque las esferas no son capaces de salir y quedan atrapadas entre los poros.

Las microesferas que mejores resultados presentaron fueron las de 300 y 400 nm. Las de 300 nm daban lugar a bandas con una menor intensidad, pero presentaban una menor tendencia a dar falsos positivos.

Para la elección de uno u otro tamaño, antes se realizaron otro tipo de ensayos, en cuanto a la cantidad de conjugado en la tira, variando la concentración desde 0,1% al 0,4%, y la concentración de antígeno en la superficie de las esferas de color, desde 1 a 3 mg/m<sup>2</sup>. Estos ensayos fueron hechos en tiras con la membrana ya elegida y la concentración determinada de anticuerpo sobre la línea test, que fue de 1 mg/ml.

Para ambos tamaños de esfera la menor intensidad en los positivos se obtuvo con 1 mg/m<sup>2</sup> de antígeno sobre la superficie, siendo la misma al utilizar 2 ó 3 mg/m<sup>2</sup>, por tanto se decidió emplear a partir de este momento 2 mg/m<sup>2</sup>.

En cuanto a la cantidad de esferas por tira, a 0,3 y 0,4 % en ocasiones se obtenían falsos positivos y un fondo sucio. Se optó por aplicarlas al 0,2%, consiguiéndose así una mayor sensibilidad que al 0,1%.

Otro factor que se modificó fue el tampón en el que se resuspenden los conjugados antes de proceder a su secado sobre las fibras absorbentes. Se probó completo y al 50% en agua destilada, sin observarse diferencias, por lo que se optó por utilizarlo completo.

Nuestro principal interés era aumentar al máximo la sensibilidad de las tiras, y por ello nos decantamos por las partículas coloreadas de 400 nm, que presentaban una mayor intensidad en las bandas con sueros positivos.

### 5. Dilución del suero

Para evitar los falsos positivos y sin embargo mantener la sensibilidad, se trató de ajustar la composición del tampón de dilución del suero, elegido para este tamaño de esfera. Se probó a variar la concentración de sales, el pH y la cantidad de detergente en el tampón. Este último factor afectaba mucho al resultado de la prueba.

La dilución final del suero se fijó en 1:10 en un volumen de 100 µl a aplicar en la tira.

### 6. Otros formatos

Con el fin de conseguir aumentar el tiempo de contacto entre suero y conjugados, se ensayaron distintos formatos de tira teniendo en cuenta las características ya seleccionadas, probando sin embargo distintos tamaños de esferas y concentraciones de estas en el test.

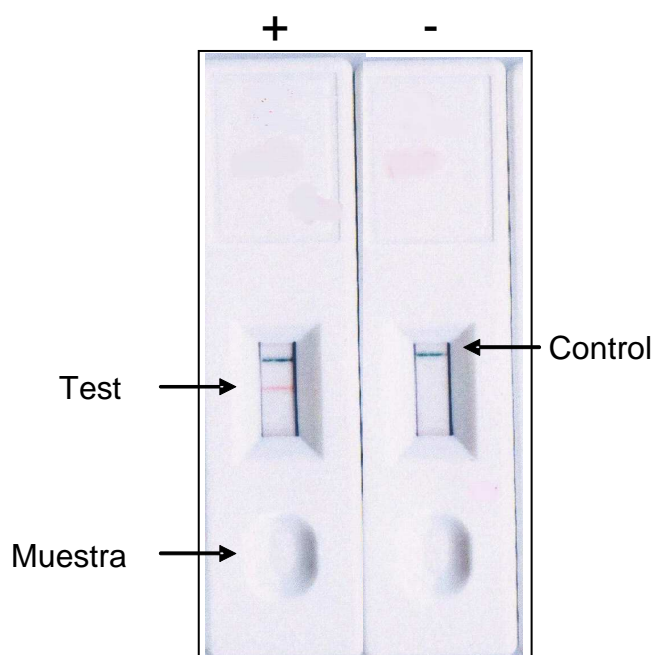
Las tiras construidas con los conjugados dispuestos en el extremo final de la tira presentaron poca repetitividad en los resultados. Esto se debió a que una cantidad variable de esferas se quedaba atrapada entre las fibras absorbentes, de modo que en cada ensayo no pasaba la misma cantidad de conjugados a la membrana.

Se realizaron también dos modelos que permitían incubar el suero con los conjugados antes de correr la tira. Estos ensayos demostraron que la sensibilidad e intensidad de las bandas aumentaba tras una incubación previa de 5 minutos.

Las tiras construidas siguiendo el modelo 3 representado en la figura 14 del apartado de Materiales y Métodos, en el que se utilizaban hisopos que contenían las microesferas, presentaron una baja repetitividad de los resultados, puesto que la cantidad de esferas que pasan al tampón de dilución del suero no se puede controlar, de modo que en unos casos habrá más microesferas disponibles para pasar a la tira que en otros.

En las tiras basadas en el modelo 2 de la figura 14 en Materiales y Métodos, en el que los conjugados eran depositados sobre fibras absorbentes separadas de la tira, se lograron ver los positivos límite en un tiempo de 15 minutos. Este fue el mejor de los 3 formatos, sin embargo el modelo que finalmente elegimos fue el basado en la tira estándar (figura 13), con las condiciones descritas en el apartado anterior, ya que era un formato más cómodo, presentaba una mayor repetitividad de los resultados y una mayor especificidad, a pesar de que las bandas perdían intensidad con los sueros positivos.

Las condiciones definitivas para este primer prototipo de test rápido de diagnóstico de la hidatidosis fueron: formato estándar, longitudes estándar de los materiales utilizados, membrana de poro medio con 1 mg/ml de anti-IgG4 en la línea test, esferas de tamaño 400 nm con 2 mg/m<sup>2</sup> de antígeno 2B2t en su superficie, 0,2% de conjugado depositado sobre las fibras absorbentes de la tira, uso de tampón de dilución de los conjugados sin diluir, dilución final del suero 1:10 en un volumen de 100 µl a aplicar en la tira, 10 minutos de desarrollo del test.



**Figura 27.** Prototipo de tiras de diagnóstico rápido basadas en la inmunocromatografía, desarrolladas en la empresa Certest Biotec. Se muestra un ejemplo de suero positivo (+) y otro de suero negativo (-). Test, indica la línea que muestra un resultado positivo del test; Control, línea de control del test; Muestra, lugar donde se aplica la muestra diluida.

#### 5.4.1.1.1. COMPARACIÓN DE LAS TIRAS INMUNOCROMATOGRÁFICAS DE CERTEST CON EL ELISA-2B2t Y DOS TESTS COMERCIALES

El prototipo de tira desarrollado en Certest Biotec fue testado con 405 sueros de pacientes con hidatidosis (procedentes de Perú), donantes sanos, pacientes con hepatitis y pacientes con otras parasitosis. Los resultados de especificidad obtenidos para cada tipo de patología y la sensibilidad con los sueros de pacientes con hidatidosis para las tiras son comparados con los obtenidos en ELISA utilizando el mismo antígeno recombinante (2B2t) y en HAI (Fumouze) en la tabla 22 y en la figura 28.

La sensibilidad del kit comercial de HAI y de nuestras tiras quedó muy por debajo del valor obtenido en el ELISA (87,6%). Entre estos dos, las tiras resultaron ser más sensibles que la HAI (41,9% y 34,9% respectivamente).

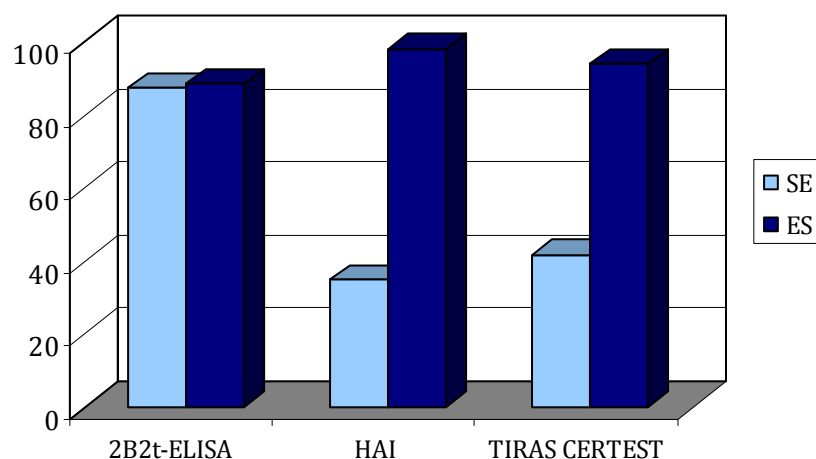
En cuanto a la especificidad total la HAI presentó el valor más elevado (98,2%) seguido de cerca por las tiras inmunocromatográficas (94,1%). Ambos tests presentaron la mayor proporción de reacciones cruzadas con los sueros de pacientes con hidatidosis alveolar. Además la tiras inmunocromatográficas presentaron el mayor número de falsos positivos con donantes sanos.

El ELISA con el antígeno 2B2t mostró una disminución en su especificidad debido principalmente a las reacciones cruzadas con los sueros de neurocisticercosis.

**Tabla 22.** Comparación de la sensibilidad y especificidad del antígeno recombinante 2B2t en ELISA-IgG y del kit comercial de hemaglutinación indirecta (HAI) con las tiras inmunocromatográficas para el diagnóstico de pacientes con hidatidosis.

	<b>2B2t-ELISA</b>	<b>HAI</b>	<b>TIRAS CERTEST</b>
<b>Casos confirmados, n=186 (Sensibilidad)</b>	163 (87,6%)	65 (34,9%)	78 (41,9%)
<b>Donantes, n=110 (Especificidad)</b>	1 (99,1%)	0 (100%)	5 (95,4%)
<b>Reacciones cruzadas, n=109</b>			
Hidatidosis alveolar, n=6	1 (16,7%)	2 (33,3%)	2 (33,3%)
Neurocisticercosis Perú, n=57	21 (36,8%)	1 (1,7%)	6 (10,5%)
Teniosis Perú, n=10	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)
Hepatitis, n=36	1 (2,8%)	1 (2,8%)	0 (0%)
<b>Especificidad total (RC+donantes), n=219</b>	25 (88,6%)	4 (98,2%)	13 (94,1%)

Los resultados son mostrados como número de sueros positivos frente a las diferentes herramientas diagnósticas, y las sensibilidades, especificidades y reacciones cruzadas correspondientes se muestran entre paréntesis como porcentajes. n, número.



**Figura 28.** Sensibilidad y especificidad total obtenida con cada uno de los tests. La sensibilidad mostrada (SE) es la obtenida con los sueros de pacientes con hidatidosis. La especificidad mostrada (ES) se corresponde a la total, calculada con los sueros de donantes sanos, pacientes con hepatitis y otras parasitosis relacionadas.

Con los sueros procedentes de Perú de pacientes con hidatidosis unilocular, se estudió la sensibilidad de las tiras para cada una de las características clínicas conocidas para este grupo de pacientes, que fueron comparadas con el test chi-cuadrado (tabla 23). Al igual que ocurría con el ELISA-2B2t, se muestran sensibilidades significativamente diferentes según el número de quistes, siendo mayor para múltiples que para únicos. Adicionalmente, se observaron diferencias en cuanto al tipo quístico según la clasificación de la OMS (menor sensibilidad para quistes CE1 que para quistes CE2 a CE4) y en cuanto a la existencia de antecedentes de hidatidosis.



**Tabla 23.** Sensibilidad de las tiras inmunocromatográficas desarrolladas en Certest Biotec según diferentes características clínicas del paciente.

		<b>Positivos (SE)</b>	<b>P</b>
<b>NÚMERO DE QUISTES</b>	<b>Único (108)</b>	32 (29,6%)	<b>0,000</b>
	<b>Múltiple (78)</b>	47 (60,3%)	
<b>LOCALIZACIÓN QUISTICA</b>	<b>Hígado (65)</b>	21 (32,3%)	0,355
	<b>Pulmón (86)</b>	33 (38,4%)	
<b>CLASIFICACIÓN OMS*</b>	<b>CE1 (44)</b>	11 (25%)	<b>0,029</b>
	<b>CE2 a CE4 (32)</b>	16 (50%)	
<b>COMPLICACIONES</b>	<b>No (87)</b>	27 (31%)	0,158
	<b>Sí (98)</b>	53 (54,1%)	
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>Sí (20)</b>	15 (75%)	<b>0,002</b>
	<b>No (166)</b>	64 (38,8%)	
<b>MOMENTO DE TOMA DEL SUERO RESPECTO AL TRATAMIENTO</b>	<b>Antes (129)</b>	52 (40,3%)	0,162
	<b>Después (57)</b>	28 (49,1%)	

Las diferencias se consideran significativas a valores de  $P < 0.05$  (en negrita). SE, sensibilidad. \* calculado solo para quistes en el hígado.

La empresa Vircell cuenta con unas tiras inmunocromatográficas para el diagnóstico de la hidatidosis, basadas en el mismo principio que las desarrolladas por nosotros en Certest Biotec. Sin embargo, la empresa Vircell utiliza antígenos purificados nativos del parásito, que se sitúan tanto en la línea test como en el conjugado, mientras las elaboradas por nosotros contienen el antígeno recombinante, que solo se encuentra en el conjugado.

Para comparar estas tiras con las nuestras, se utilizaron 50 sueros de pacientes con hidatidosis y 34 de donantes. Los resultados obtenidos con cada grupo son mostrados en la tabla 24, donde se muestra que las tiras de Vircell aparecen como las más sensibles, aunque no las más específicas, a pesar de que los falsos positivos en

estas tiras presentaron una intensidad relativamente baja (generalmente de 0,5 según su patrón) en la línea test.

**Tabla 24.** Comparación de la sensibilidad y especificidad de los tests inmunocromatográficos desarrollados en Certest Biotec con el antígeno recombinante 2B2t y en Vircell con antígenos nativos.

	SUEROS HIDATIDOSIS (n=50)		SUEROS DONANTES (n=34)	
	+	SENS (%)	+	ESP (%)
CERTEST BIOTEC	31	62	1	97
VIRCELL	40	80	6*	82,4

En la tabla se muestra el número de sueros positivos (+) con cada una de las tiras para los sueros de pacientes con hidatidosis y para los de donantes. SENS, sensibilidad y ESP, especificidad dadas en porcentaje para cada una de las tiras. \*de los 6 resultados positivos para sueros de donantes con las tiras de Vircell, 4 de ellos estaban en el límite de la positividad con un valor de intensidad de 0,5.

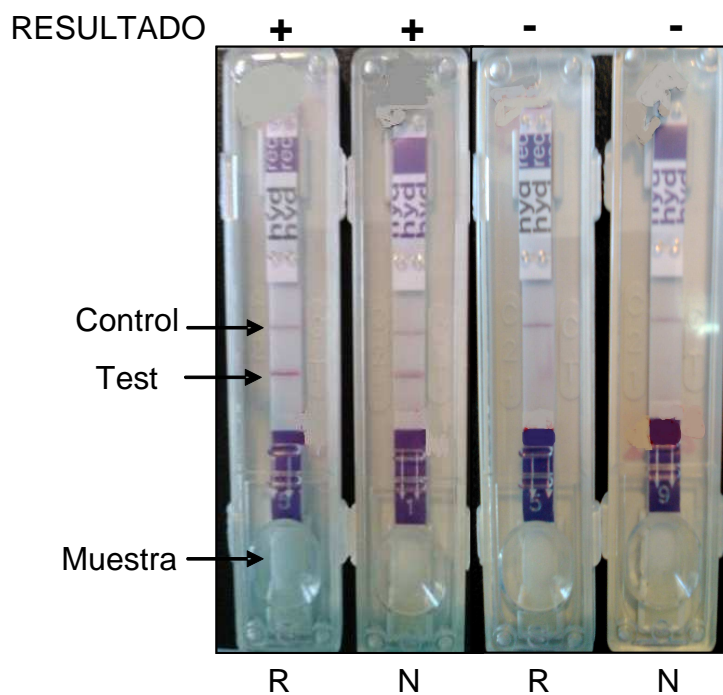
#### 5.4.1.2. SEGUNDA APROXIMACIÓN: DESARROLLO EN VIRCELL SL

La empresa Vircell mostró interés en probar el antígeno recombinante 2B2t en sus tiras, para reemplazar a los antígenos nativos si se obtenían buenos resultados. Sin embargo, tras sustituir el nativo por el recombinante en las dos posiciones, línea test y conjugado, no se obtenía apenas intensidad con sueros positivos. Tras varias pruebas, la que mejor funcionó fue aquella en la que se combinaban los antígenos nativos dispuestos en el conjugado y el antígeno recombinante sobre la tira test.

##### 5.4.1.2.1. COMPARACIÓN DE LOS DOS TESTS INMUNOCROMATOGRÁFICOS ELABORADOS EN VIRCELL JUNTO CON EL ELISA 2B2T

La sensibilidad y especificidad de ambos tests desarrollados por Vircell (figura 29) fueron testadas en nuestro laboratorio. Para el cálculo de la sensibilidad se pasaron por las tiras 385 sueros de pacientes con hidatidosis procedentes de Italia y Alemania. Para determinar la especificidad se utilizaron 50 sueros de pacientes con hidatidosis alveolar, 4 *pools* de pacientes con neurocisticercosis y 36 sueros de

donantes. Los resultados obtenidos fueron a su vez comparados con los del ELISA con el antígeno recombinante 2B2t (tabla 25 y figura 30).

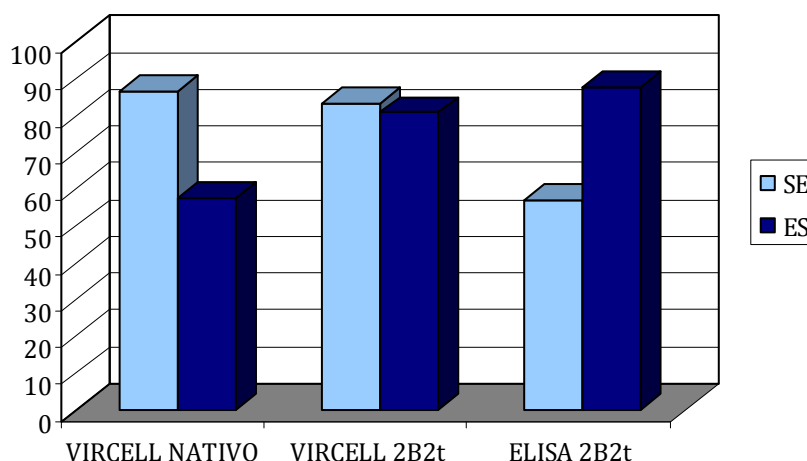


**Figura 29.** Tests de diagnóstico rápido desarrollados en Vircell para el diagnóstico de la hidatidosis. R, tira que transporta el recombinante 2B2t; N, tira elaborada solo con antígenos nativos; +, indica resultado positivo de la prueba; -, indica resultado negativo de la prueba; Test, indica la línea que muestra un resultado positivo del test; Control, línea de control del test; Muestra, lugar donde se aplica la muestra diluida.

**Tabla 25.** Comparación de las tiras hechas en Vircell con el antígeno nativo y con el recombinante 2B2t con el ELISA-2B2t.

	VIRCELL NATIVO	VIRCELL 2B2t	ELISA 2B2t
<b>Casos confirmados, n=385 (Sensibilidad)</b>	334 (86,8%)	321 (83,4%)	220 (57,1%)
<b>Donantes, n=36 (Especificidad)</b>	2 (94,4%)	0 (100%)	1 (97,2%)
<b>Reacciones cruzadas, n=54</b>			
Hidatidosis alveolar, n=50	33 (66%)	16 (32%)	8 (16%)
Neurocisticercosis, n=4	3 (75%)	1 (25%)	2 (50%)
<b>Especificidad total (RC+donantes), n=90</b>	38 (57,8%)	17 (81,1%)	11 (87,8%)

Los resultados son mostrados como número de sueros positivos frente a las diferentes herramientas diagnósticas. Las sensibilidades, especificidades y reacciones cruzadas correspondientes se muestran entre paréntesis como porcentajes. Especificidad total es la calculada con los sueros de donantes junto con las reacciones cruzadas, n, número.

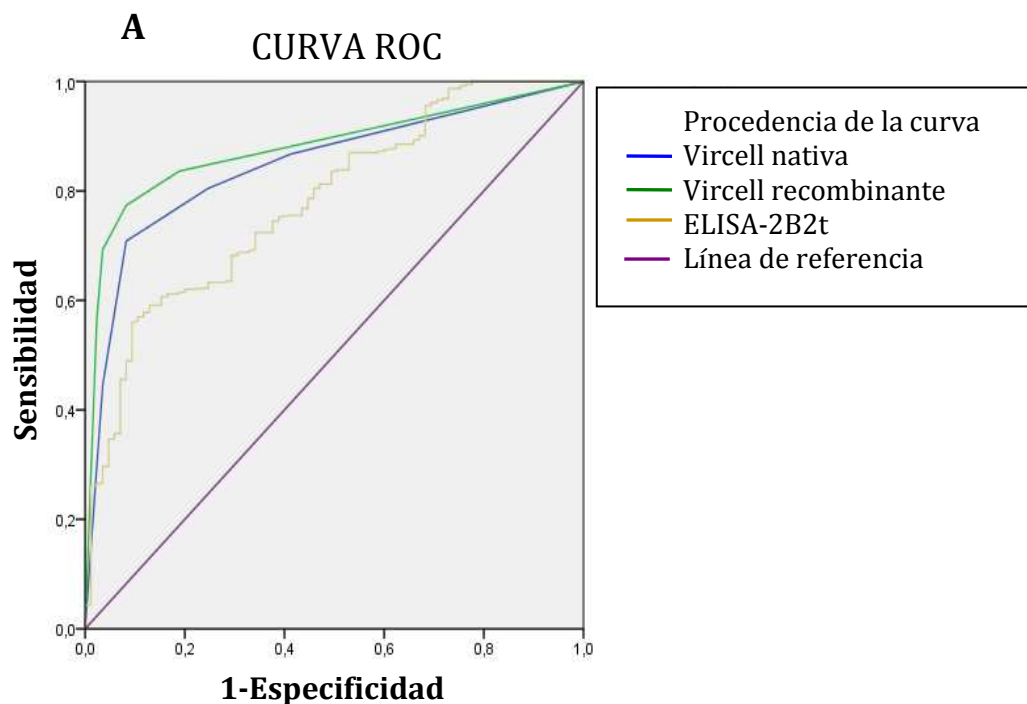


**Figura 30.** Sensibilidad y especificidad total obtenida con cada uno de los tests. La sensibilidad mostrada (SE) es la obtenida con los 385 sueros de pacientes con hidatidosis. La especificidad mostrada (ES) se corresponde a la total calculada con los sueros de donantes sanos y otras parasitosis relacionadas.

Las tiras desarrolladas con antígenos nativos mostraron ser un poco más sensibles que las que contenían antígeno recombinante, siendo sin embargo estas últimas más específicas, mostrando además mucho menos frecuentemente reacciones cruzadas (tabla 25). El mayor número de reacciones cruzadas para ambos tests inmunocromatográficos aparecieron con los pacientes con hidatidosis alveolar seguidos por los que presentaban neurocisticercosis, aunque hay que mencionar que el número de sueros de pacientes con esta última enfermedad fue muy limitado. Si tenemos en cuenta, además, la escala numérica proporcionada por Vircell para la interpretación de la intensidad de la banda problema, se encontraron mucho más frecuentemente reacciones en las tiras nativas, que aunque por debajo de 0,5, pueden dar lugar a interpretaciones erróneas (falsos positivos), que en el caso de las tiras recombinantes, que cuando fueron negativas en estos casos, no mostraron ninguna reacción. Así, en el caso de las tiras nativas, un total de 17 sueros de donantes o de pacientes con otras parasitosis dieron lugar a reacciones entre 0 y 0,5, mientras que solo 8 de esos sueros dieron lugar a reacciones similares en las tiras recombinantes.

Para el ELISA con el antígeno 2B2t, aunque su especificidad es mejor y presenta menor número de reacciones cruzadas que cualquiera de las dos tiras, se obtuvo una sensibilidad con estos sueros mucho menor que la de las dos tiras (57,1%).

Con estos mismos sueros se construyeron las curvas ROC correspondientes a cada uno de estos tests, mediante la representación de valores de IS en el caso del ELISA y para las dos tiras se representaron los valores de intensidad de la banda comprendidos entre 0 y 3 (figura 31A). Estas curvas mostraron que las tiras que transportan el antígeno 2B2t recombinante dan lugar a un valor mayor de ABC (figura 31B) y por tanto presentan una mejor eficiencia en el diagnóstico que las que llevan el antígeno nativo purificado aunque cuando el valor de ABC es comparado con el obtenido con las tiras con el antígeno nativo no se observan diferencias significativas estadísticamente (figura 31C).



**B**

ÁREA BAJO LA CURVA				
Variables resultado de contraste	Área	Error típico.	Sig. asintótica	Intervalo de confianza
VIRCELL NATIVA	0,846	0,021	0,000	0,8-0,89
VIRCELL RECOMBINANTE	0,879	0,018	0,000	0,84-0,91
ELISA-2B2t	0,780	0,026	0,000	0,73-0,83

**C**

PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE ÁREAS				
	VIRCELL RECOMBINANTE		ELISA-2B2t	
	Ji-cuadrado	Valor P	Ji-cuadrado	Valor P
VIRCELL NATIVO	0,6518	0,419	17,3281	0,000
VIRCELL RECOMBINANTE			27,316	0,000

**Figura 31.** Comparación de la eficiencia diagnóstica de las tiras inmunocromatográficas transportando antígeno nativo o el antígeno recombinante 2B2t y del ELISA-2B2t mediante curva ROC. A. Curva ROC de cada uno de los test llevados a cabo. La curva fue construida con los valores de IS obtenidos con los 385 sueros de pacientes con hidatidosis y con los 90 sueros de individuos sanos y con parasitosis relacionadas para cada test diagnóstico. B. Cálculo del área bajo la curva ROC de cada test, indicándose también el error estándar, significancia e intervalo de confianza al 95%. C. Diferencias significativas entre los valores de ABC calculados tras la comparación dos a dos de las pruebas diagnósticas.

Mediante el uso de tablas de contingencia y el test chi-cuadrado se calculó y comparó la sensibilidad obtenida con cada test para cada característica clínica del paciente (tabla 26). Las sensibilidades en ambas tiras fueron significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) para todas las variables, excepto para el órgano afectado. Para el ELISA-2B2t son todas significativamente diferentes.

Los valores de sensibilidad dados para una y otra tira son muy similares para pacientes con quistes no hepáticos, con quistes activos o en recogida de suero tras un tratamiento. En los otros casos, los valores de sensibilidad son siempre un poco mayores para las tiras con antígeno nativo.

Las diferencias en las sensibilidades mostradas dentro de cada variable con el ELISA 2B2t son en general mayores que con las tiras, por lo que parece que los resultados del ELISA están más afectados que los de las tiras por las características clínicas que presente el paciente. Para comprobar cuáles eran las variables más influyentes en el resultado de cada prueba se realizó un análisis de regresión logística multivariada (tabla 26). Los resultados indican que las tiras con antígeno nativo solo están influidas por el estadio quístico, siendo más probable que el resultado de la prueba sea positivo ante quistes activos. Las tiras con antígeno recombinante parecen estar afectadas por todas las variables aquí estudiadas excepto la localización quística, siendo el factor más influyente en el resultado el estadio quístico. El ELISA-2B2t con este panel de sueros está influenciado por el número de quistes y estadio quístico siendo este último factor el más potente.

**Tabla 26.** Comparación de las tiras Vircell con antígeno nativo con las que llevan el antígeno recombinante 2B2t y a su vez comparación con el ELISA-2B2t para diferentes características clínicas del paciente.

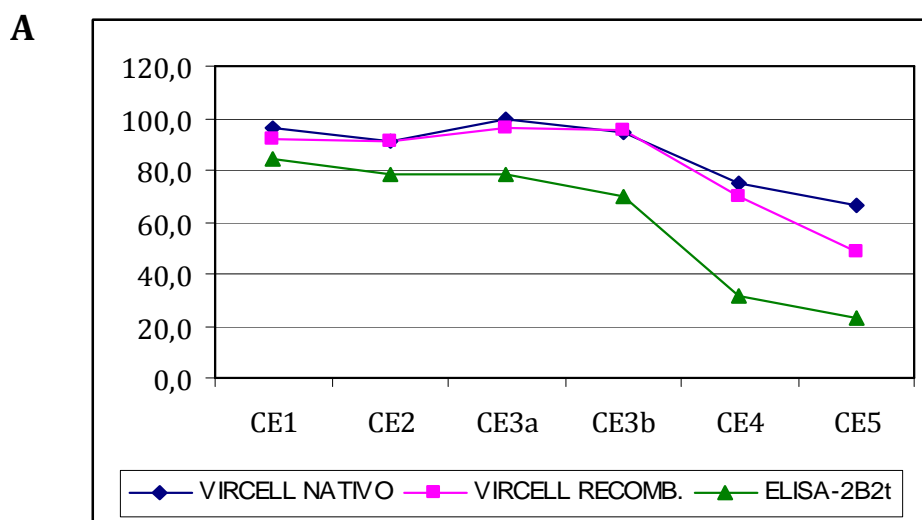
	VIRCELL NATIVO			VIRCELL-2B2t			ELISA-2B2t		
	SE% (+)	P	M-OR (IC)	SE% (+)	P	M-OR (IC)	SE% (+)	P	M-OR (IC)
<b>NÚMERO DE QUISTES</b>	Único (233)	83,7% (195)	1	79% (184)		1	48,1% (112)		1
	Múltiples (152)	90,8% (138)	0,037 (0,89-3,6)	89,5% (136)	0,006 (1,1-4,1)	2,1 (1,1-4,1)	71% (108)	0,000 (1,7-4,5)	2,8 (1,7-4,5)
<b>LOCALIZACIÓN</b>	Hígado (365)	86,3% (315)	1	82,7% (302)		1	55,6% (203)		1
	Otras (20)	95% (19)	0,229 (0,16-11,4)	95% (19)	0,22 (0,2-14,5)	1,6 (0,2-14,5)	85% (17)	0,010 (0,6-9,6)	2,4 (0,6-9,6)
<b>CLASIFICACIÓN OMS</b>	CE4+5 (146)	72,6% (106)	1	64,4% (94)		1	74,1% (177)		1
	CE1+2+3 (239)	95,4% (228)	0,000 (3,1-13,6)	95% (227)	0,000 (4,2-16,8)	8,4 (4,2-16,8)	29,5% (43)	0,000 (3,9-10,4)	6,4 (3,9-10,4)
<b>COLECTA DEL SUERO</b>	Antes del trat. (225)	82,2% (185)	1	76,4% (172)		1	49,3% (111)		1
	Después del trat. (160)	93,1% (148)	0,002 (0,8-3,6)	95% (227)	0,000 (1,2-5,1)	2,5 (1,2-5,1)	68,6% (109)	0,000 (0,9-2,3)	1,4 (0,9-2,3)

SE% (+), sensibilidad y número de positivos. Las diferencias en la sensibilidad según variables clínicas fueron evaluadas por el test chi-cuadrado considerándolas significativas a valores de  $P < 0.050$  (celdas grises). La asociación entre las variables enumeradas y la sensibilidad de cada técnica se evaluó mediante regresión logística multivariada, M-OR (IC), dándose los valores de odds ratio y el intervalos de confianza en paréntesis. Los valores significativos aparecen en negrita.



Puesto que ciertos pacientes serán más probablemente negativos con el recombinante, y en ciertas ocasiones es deseable que así sea, refiriéndonos concretamente a la clasificación quística, realizamos una comparación más detallada de los valores de positividad para cada uno de los tipos de quiste según su imagen (figura 32). Las mayores diferencias se encuentran para los quistes CE1, para los cuales la tira con nativo se muestra más sensible que el recombinante, y para los quistes CE4 y CE5, especialmente para estos últimos, en los que la diferencia de positividad (mucho mayor para el nativo) es muy acentuada. Los quistes CE2 y CE3a-b muestran una positividad comparable en ambas tiras.

La diferencia entre los distintos tipos quísticos también en el caso del ELISA es más acentuada que con las tiras inmunocromatográficas, pero la sensibilidad también es menor con los quistes en estadios inactivos.



## B

		CE1	CE2	CE3a	CE3b	CE4	CE5
	N	25	23	51	140	107	39
VIRCELL nativo	+	24	21	51	132	80	26
	%	96,0	91,3	100,0	94,3	74,8	66,7
VIRCELL recombinante	+	23	21	49	134	75	19
	%	92,0	91,3	96,1	95,7	70,1	48,7
ELISA-2B2t	+	21	18	40	98	34	9
	%	84,0	78,3	78,4	70,0	31,8	23,1

**Figura 32.** Comparación de las tiras con antígeno nativo y recombinante y del ELISA-2B2t en cuanto a su sensibilidad con cada estadio quístico. A. Representación de los porcentajes de positividad para cada estadio quístico con cada uno de los tests. B. Se indican para cada una de las técnicas a evaluar el número de sueros correspondientes a cada uno de los estadios quísticos (N), el número de sueros positivos para cada estadio (+) y el porcentaje de positividad (%) para cada tira y el ELISA-2B2t.

Las tiras con nativo y recombinante se utilizaron también para evaluar comparativamente su utilidad en el seguimiento de pacientes. Debido a la limitada disponibilidad de sueros en cantidad suficiente para realizar la técnica inmunocromatográfica (30 µl/tira), esta comparación se limitó al grupo de pacientes tratados por cirugía o aspiración, sin incluirse en este caso pacientes tratados farmacológicamente o en *watch and wait*.

En la tabla 27A se muestran los resultados para pacientes curados, y en la tabla 27B los de pacientes no curados, en sueros recogidos a distintos tiempos post-tratamiento.

El ELISA-2B2t fue la técnica que negativizó más rápidamente con los pacientes curados. De los 19 pacientes curados, 12 llegaron a ser negativos durante el período de seguimiento, y de los 7 restantes en 6 de ellos se observa un descenso progresivo del índice serológico en el período de tiempo en el que fueron tomados, quedando un paciente en el que se mantiene constante el índice serológico, aunque este último caso solo fue seguido por 6 meses tras la cirugía (paciente 412).

Las tiras con antígeno recombinante negativizan antes y más frecuentemente que las que llevan el antígeno nativo (figura 33). Con las tiras recombinantes, 9 de los pacientes curados llegaron a ser negativos, mientras que con las tiras nativas solo 5 pacientes negativizaron para los mismos períodos de tiempo. Los pacientes que negativizaron con ambas tiras lo hacen en menos tiempo con las tiras recombinantes

(pacientes 312, 339 y 391) coincidiendo la negativización de tiras recombinantes y nativas solo en dos pacientes en cuanto al tiempo post-tratamiento transcurrido (pacientes 349 y 398).

En los casos en los que al final del seguimiento los sueros aún eran positivos con ambas tiras, se observa sin embargo, una disminución de la intensidad de la línea test mayor y más rápida con las tiras recombinantes, como se puede observar en la tabla 27A con los pacientes 37, 247, 270, 311, 315, 353 y 407. Solo los pacientes 336 y 412 muestran una bajada mayor de la intensidad de la reacción con las tiras nativas que con las recombinantes para el mismo período de tiempo.

En algunos casos sí hay coincidencia del momento de negativización entre el ELISA y la tira recombinante (pacientes 317, 339, 387, 391 y 398) pero en general el ELISA negativiza antes que las tiras.

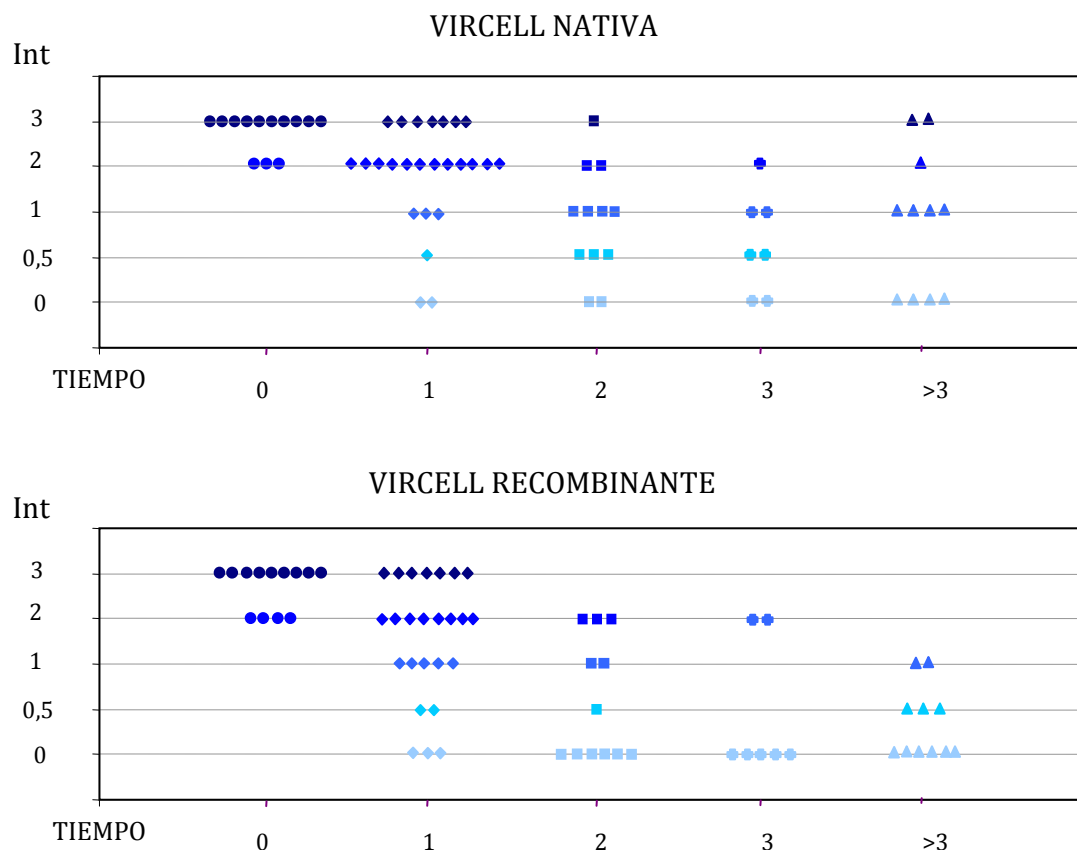
**Tabla 27.** Valores obtenidos con las tiras realizadas con antígeno recombinante 2B2t, con las tiras que llevan un antígeno purificado y valores de IS obtenidos con el ELISA-2B2t.

A. PACIENTES CURADOS				
Nº	TIEMPO	E-2B2t	REC	NAT
23	0	135	2	2
23	1,8	77	0,5	1
23	2,5	63	0	1
37	0,1	17	1	1
37	0,2	-19	0,5	1
247	0,3	23	2	3
247	0,9	-44	1	2
270	0	81	2	2
270	0,2	181	2	2
270	4,0	6	0,5	1
308	0	183	3	3
308	0,7	-35	0,5	2
308	5,4	-31	0	1
311	0,0	134	3	3
311	0,8	92	2	3
311	2,0	-30	1	3
311	3,3	-32	0,5	3
311	6,9	-43	0,5	3
312	0,1	119	3	3
312	0,9	-15	1	0,5
312	1,6	-36	0	0,5
312	2,5	-42	0	0
312	3,5	-55	0	0
312	4,5	-56	0	0
315	0	219	3	3
315	0,7	68	2	3
315	1,1	97	2	2
317	0	180	3	3
317	0,7	63	1	2
317	2,0	-5	0	1
317	3,6	-25	0	1
336	0,0	313	3	3
336	1,0	105	2	2
336	2,0	71	2	1
336	2,9	23	2	1
339	0	258	3	3
339	0,5	209	3	2
339	1,5	26	1	1
339	2,5	-52	0	0,5
339	4,0	-52	0	0

B. PACIENTES NO CURADOS				
Nº	TIEMPO	E-2B2t	REC	NAT
1	8,9	27	2	2
1	9,4	160	2	2
1	9,7	106	3	3
1	10,9	300	3	2
3	0	4	3	3
3	1	303	3	2
4	2	101	3	3
4	5	112	3	3
4	6	61	3	3
5	4	165	3	3
5	6	302	3	3
13	1,9	237	3	3
13	2,6	225	3	2
13	3,7	250	3	3
14	0,8	129	3	3
14	1,3	101	3	3
14	2,9	67	3	2
15	0,0	239	3	3
15	0,4	250	3	2
15	0,8	204	3	2
15	1,6	253	3	2
15	2,8	283	3	2
15	3,4	298	3	2
15	3,6	300	2	3
15	4,3	221	3	3
15	5,1	259	3	2
17	0,0	296	3	3
17	0,6	297	3	3
17	2,3	248	3	3
18	0	287	3	3
18	0,3	310	3	3
18	2,4	300	3	3
18	1,7	305	3	3
19	1,0	245	2	0,5
19	2,0	207	2	0,5

PACIENTES CURADOS				
Nº	TIEMPO	E-2B2t	REC	NAT
349	0,2	21	0	0
349	0,6	-7	0	0
349	1,7	-24	0	0
349	2,6	-25	0	0
353	0,0	318	3	2
353	0,8	114	2	2
353	1,2	79	2	2
353	3,9	49	1	2
361	0	332	3	3
361	0,7	284	3	2
361	2,4	36	2	2
361	3,4	8	1	1
387	0	80	2	3
387	1,0	-57	0	1
387	1,9	-56	0	0,5
387	2,9	-41	0	0,5
391	1,0	138	2	2
391	1,2	-46	0	0,5
391	3,3	-58	0	0
398	0,2	67	2	2
398	1,3	-45	0	0
407	0,0	71	2	3
407	0,5	-32	1	2
412	0,0	271	3	3
412	0,1	375	3	3
412	0,2	316	3	3
412	0,3	299	3	3
412	0,5	218	3	2

Nº, número de paciente; Tiempo, tiempo en años transcurrido desde la intervención a la recogida del suero; E-2B2t, resultado obtenido en ELISA-2B2t mostrados en unidades de índice serológico menos 50 (IS-50) de modo que los valores con signo negativo son considerados resultados negativos en el ELISA; REC, resultados obtenidos con las tiras inmunocromatográficas con antígeno recombinante 2B2t; NAT, resultados obtenidos con las tiras inmunocromatográficas con antígeno nativo. Se consideran valores positivos de 0,5 a 3 correspondiendo esta medida con la intensidad de color mostrada en la línea test.



**Figura 33.** Representación de los valores de intensidad obtenidos con los sueros de pacientes en seguimiento tras cirugía o aspiración curados con las dos tiras de Vircell a comparar. Int, indica intensidad de la banda de resultado según las categorías indicadas por la casa comercial (figura 15 en Materiales y Métodos), dándose como resultado negativo las intensidades menores de 0,5. TIEMPO: 0 indican los sueros recogidos antes o justo tras la cirugía o aspiración; 1, 2 y 3 indican los sueros recogidos durante el primero, segundo y tercer año tras la intervención, y >3, indica los sueros recogidos con posterioridad a los 3 años llegando a los 6,9 años.

#### 5.4.2. TIRAS PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENO B2

Tras la serie de pruebas hechas modificando diversos factores en la tira para la detección de antígenos, el prototipo final se construyó con membranas de poro tamaño estándar, llevando el anticuerpo específico anti-B2 a una concentración de 0,6 mg/ml sobre la línea test.

Los conjugados estuvieron formados por microesferas de 300 nm recubiertas por los mismos anticuerpos, a una concentración de 2 mg/ml. Los conjugados se dispusieron sobre las fibras absorbentes de la tira a una concentración de 0,2% resuspendidos previamente en tampón 1x.

El volumen de muestra a aplicar fue de 100  $\mu$ l si esta era muy fluida, sino era el caso podía ser diluida con agua destilada.

Las pruebas hechas con el recombinante B2t mostraron que la tira era capaz de detectar niveles de la proteína de hasta 1  $\mu$ g. Cuando se hicieron pruebas con el LH de *E. granulosus*, las tiras dieron señal positiva cuando la cantidad de proteína total del LH fue de 5  $\mu$ g. Los resultados obtenidos con distintas muestras parasitológicas se muestran a continuación en la tabla 28.

**Tabla 28.** Ensayos de especificidad de las tiras inmunocromatográficas para la detección de antígeno B2.

PARÁSITO	HOSPEDADOR	RESULTADO
<i>E. granulosus</i>	oveja	+
	humano	+
	camello	+/-
<i>E. multilocularis</i>		+
<i>E. vogeli</i>		+/-
<i>T. solium</i>		-
<i>T. crassiceps</i>		-

Las muestras de LH procedentes de quistes de *E. granulosus* fueron colectadas de diferentes hospedadores. Los resultados de la tira son dados como: +, positivo, +/-, positivo muy débil, - negativo.

Tras este ensayo se observó que las tiras dan lugar a reacciones de diferente intensidad para el LH de *E. granulosus*, dependiendo del hospedador de origen, dando también lugar a reacciones de intensidad variable con otras especies del género. Sin embargo, no se encontró ninguna reacción positiva con fluido procedente de cisticercos de especies de *Taenia*.





## **6. DISCUSIÓN**

---



En la actualidad aún no se ha conseguido un test estandarizado para el serodiagnóstico de la hidatidosis, debido a la baja especificidad y sensibilidad de las herramientas comerciales disponibles y a la falta de una apropiada evaluación de los antígenos utilizados. En la literatura se han descrito varios antígenos recombinantes con potencial para sustituir a los antígenos nativos, pero ninguno de ellos ha sido testado sistemáticamente para el desarrollo diagnóstico considerando la compleja presentación clínica de la hidatidosis.

A este respecto, nuestro grupo propuso anteriormente, en un desarrollo que constituyó el Trabajo de Grado germen de esta Tesis, el uso de una versión truncada del polipéptido B2 (B2t), para el diagnóstico y monitorización de pacientes con hidatidosis en la técnica ELISA. El ELISA-B2t mostró un excelente rendimiento diagnóstico (91.2% sensibilidad y 93% especificidad) y demostró ser útil para detectar la curación en pacientes quirúrgicamente tratados (Hernández-González y cols., 2008).

Ya que un porcentaje de pacientes confirmados, cercano al 10%, había resultado negativo frente al antígeno B2t, con el fin de producir un nuevo antígeno que lograra aumentar esta sensibilidad, se diseñaron 3 polipéptidos constituidos por 2, 4 y 8 subunidades repetidas del antígeno B2t para su expresión, purificación y posterior uso en técnicas diagnósticas. La elección de la producción de estos tándems estuvo basada en los resultados de otros autores que muestran un incremento de la antigenicidad (sensibilidad) en el diagnóstico de enfermedades específicas, cuando dos o más subunidades de un antígeno específico son clonadas juntas (p. ej. leishmaniosis y tripanosomosis; Goto y cols., 2010; Valiente-Gabioud y cols., 2011). Además los tándems, al presentar un mayor tamaño que la proteína B2t, darían lugar a mayores rendimientos de producción como recombinantes (Lennick y cols., 1987), lo que facilitaría su aplicación a un kit comercial, objetivo final de nuestro trabajo, al resultar más eficiente y barata su producción.

## 6.1. OBTENCIÓN Y PRODUCCIÓN DE LAS NUEVAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

El recombinante B2t así como las proteínas derivadas del mismo (2B2t, 4B2t y 8B2t) fueron expresadas en la cepa de *E. coli* BL21 CodonPlus-RIL y purificadas siguiendo el protocolo descrito en Hernández-González y cols. (2008). Esta cepa fue seleccionada por su mayor nivel de expresión para la proteína B2t en forma soluble que otras cepas ensayadas en su momento. Este mayor rendimiento posiblemente fue debido a la presencia de un plásmido con múltiples copias de los genes que codifican los ARNs de transferencia, cuya ausencia puede limitar la traducción de proteínas heterólogas en *E. coli* (Terpe, 2006.).

La cantidad de proteína final purificada fue diferente para cada recombinante. Para la proteína 2B2t se lograron purificar 2,5 mg por litro de medio de cultivo procesado, prácticamente el doble que de proteína B2t purificada (1,2 mg/l). Puesto que la 2B2t pesa el doble que la B2t (16,9 kDa y 8,3 kDa respectivamente), estos resultados nos indican que el nivel de expresión en *E. coli* fue similar para ambas recombinantes y que el proceso de purificación se desarrolló con el mismo rendimiento en ambos casos, con la ventaja de poder producir dos veces más polipéptido B2t cuando se usa el recombinante 2B2t, en el mismo volumen de cultivo.

Sin embargo esto no fue así con el resto de los tándems, observándose un descenso en la producción de proteína al ir aumentando el número de subunidades B2t. Así, la producción de 4B2t no fue 4 veces superior a la B2t como cabría esperar, y la cantidad purificada de 4B2t fue levemente inferior a la obtenida con 2B2t. Con la proteína 8B2t, la disminución en su producción fue aún más acusada, de modo que apenas se consiguió obtener proteína tras el corte con trombina en el proceso de purificación.

Se descartó que la menor producción fuese debida a un problema de solubilidad de los tándems mayores, puesto que la proporción de proteína en fracciones soluble e insoluble son similares para todos los tándems. Sí se observó una bajada en el nivel de expresión general para 4B2t y 8B2t en comparación con los otros dos recombinantes, por razones que podrían atribuirse a efectos inhibitorios

debidos a la presencia de proteínas de alto peso molecular que fuesen mal toleradas por la cepa de expresión.

Debido al bajo rendimiento que presentaba la obtención del antígeno 8B2t purificado, este fue descartado, ya que uno de nuestros objetivos finales era producir una proteína para su futuro uso en una prueba diagnóstica comercial, cuya manufactura requiere de procesos de producción lo más económicos posible.

## **6.2. DIAGNÓSTICO DE LA HIDATIDOSIS**

### **6.2.1. PRESELECCIÓN DE ANTÍGENOS EN ELISA-IGG**

En una primera prueba para la determinación de la aptitud de los tándems 2B2t y 4B2t en el diagnóstico, en comparación con el recombinante B2t, los tres recombinantes fueron enfrentados a un panel de sueros en ELISA-IgG. Para ello se seleccionaron sueros previamente testados con el recombinante B2t de pacientes con hidatidosis, incluyendo además de sueros positivos y positivos límite, sueros que habían resultado negativos a B2t en la misma técnica ELISA-IgG.

El uso de la proteína 2B2t resultó en un incremento significativo en la sensibilidad, comparada con la reactividad del antígeno B2t. Sin embargo, la proporción de subunidades “B2t” es la misma independientemente del antígeno que se utilice para el tapizado, puesto que ambos antígenos se utilizaron a la misma concentración de tapizado. La explicación a estos resultados podría ser un mayor número de anticuerpos capaces de unirse por molécula de 2B2t que por molécula de B2t, debido a que el recombinante 2B2t podría presentar una mayor proporción de epítomos que quedarían expuestos tras el pegado de los antígenos a las placas de ELISA, y por tanto disponibles para la unión de anticuerpos que el B2t.

Según los trabajos ya mencionados de Goto y cols. (2010) y Valiente-Gabioud y cols. (2011), cabría esperar un aumento en la reactividad, asociado al incremento en el número de repeticiones en las respectivas proteínas recombinantes. Sin embargo, el antígeno 4B2t resultó menos reactivo frente a los sueros de pacientes con hidatidosis que el recombinante 2B2t. Estos resultados podrían deberse a cambios en la estructura espacial de la proteína 4B2t con respecto a la 2B2t, llevando consigo la

pérdida de algunos epítomos conformacionales necesarios para la unión del anticuerpo.

El incremento en el número de unidades antigénicas también resultó en un aumento en la pérdida de especificidad para el antígeno 4B2t, que mostró un mayor número de falsos positivos con sueros de donantes sanos que el antígeno B2t, mientras que el polipéptido 2B2t mostró la misma especificidad que el antígeno B2t. El fenómeno de la pérdida de especificidad relacionado con el aumento del número de unidades antigénicas repetidas, ha sido descrito anteriormente para otros antígenos recombinantes (ej. Goto y cols., 2010).

Tras estos resultados, se decidió excluir al antígeno 4B2t, debido a su falta de especificidad en relación a los recombinantes B2t y 2B2t. Puesto que los resultados de sensibilidad eran mejores para el antígeno 2B2t que para el B2t, se decidió caracterizar el nuevo tándem más profundamente.

### 6.2.2. EFICIENCIA DIAGNÓSTICA DE LOS RECOMBINANTES EN ELISA.

El ELISA con los recombinantes B2t y 2B2t fueron comparados con el LH en ELISA y con un kit comercial de hemaglutinación indirecta (HAI), puesto que estos dos ensayos son frecuentemente utilizados en la práctica clínica para el serodiagnóstico de pacientes con hidatidosis.

Para la comparación de estas pruebas diagnósticas, se eligió el análisis estadístico mediante curvas ROC, tomando como parámetro de eficiencia diagnóstica total de cada test el valor del área bajo la curva ROC (ABC). Este análisis ha sido ya utilizado para evaluar distintos antígenos de *E. granulosus* en diagnóstico por varios autores (Virginio y cols., 2003; Lorenzo y cols. 2005; List y cols., 2010), puesto que está especialmente recomendado para la validación de pruebas diagnósticas (Pita Fernández y Pértegas Díaz, 2003). En la elaboración de dichas curvas se incluyeron 186 sueros de pacientes con hidatidosis de Perú, junto con 110 de donantes sanos y 174 sueros correspondientes a pacientes con enfermedades infecciosas relacionadas con la hidatidosis antigénicamente o por dar lugar a imágenes similares.

El ELISA con el antígeno B2t mostró el valor más alto de ABC, apareciendo así como el test más eficiente, seguido del 2B2t, del LH y de la HAI. Estos resultados estuvieron motivados por el número de reacciones cruzadas, que son mayores proporcionalmente para el 2B2t y mayores aún para el LH, comparados con las detectadas para el B2t. La bajísima sensibilidad del kit comercial de HAI condicionó su valor de ABC, que quedó muy por debajo de los obtenidos con el resto de los antígenos. Sin embargo, el antígeno 2B2t fue el que se mostró más sensible.

El antígeno menos específico, el LH, ya se ha señalado por otros autores como una mezcla antigénica que puede dar lugar frecuentemente a falsos positivos, en proporción generalmente más alta que la mayoría de los antígenos recombinantes o purificados derivados del mismo (ej. Virginio y cols., 2003; Sbihi y cols., 2003; Hernández-González y cols., 2008). Las reacciones cruzadas más frecuentes fueron detectadas aquí frente a pacientes con hidatidosis alveolar (HA) y con neurocisticercosis (NCC). Los datos aportados por otros autores muestran resultados muy similares a este respecto, indicando reacciones cruzadas también con otras enfermedades parasitarias (Eckert y Deplazes, 2004), pero especialmente con pacientes con HA y NCC (ej. Poretti y cols., 1999; Carmena y cols., 2006). El porcentaje de reacciones cruzadas reportadas para el LH depende enormemente del panel de sueros utilizados, tanto en número como en tipo de pacientes. Así, Ortona y cols. (2000) señalan una especificidad para el LH comprendida entre el 96-100% según la técnica empleada. Estos autores no utilizan sueros de pacientes con HA, con un número muy escaso de sueros de pacientes con otras parasitosis, la mayoría de ellas (esquistosomosis, filariosis, triquinelosis) sin relación antigénica clara con el género *Echinococcus*, utilizando solo 5 sueros de pacientes con cisticercosis, de los cuales uno dio lugar a reacción cruzada en ELISA y cuatro (80%) en inmunoblot con LH. Estos valores, por tanto, están mediatizados y distorsionados por el panel de sueros elegido para evaluar las reacciones cruzadas del LH. Los falsos positivos detectados aquí para el LH dan valores muy similares en porcentaje a los que se encuentran por otros autores utilizando paneles de sueros comparables, siendo muy similar a la descrita por Barbieri y cols. (1998), que calculan un 40% de falsos positivos en un panel que incluye 49 sueros de pacientes con HA y cisticercosis, entre otros.

Los antígenos recombinantes B2t y 2B2t mostraron reacciones cruzadas con sueros de HA, NCC y teniosis, enfermedades ocasionadas por parásitos muy próximos taxonómicamente a *E. granulosus*. Estas reacciones cruzadas ya han sido descritas por varios autores, tanto para el antígeno B como para sus diferentes subunidades testadas bien en forma nativa o como recombinante (Carmena y cols., 2006).

La familia antigénica denominada B se ha descrito en una amplia variedad de cestodos, con diferente grado de similitud en secuencias y subunidades entre diferentes géneros (Olson y cols. 2012). En el caso de *E. granulosus*, el antígeno B es considerado género-específico, puesto que se han encontrado anticuerpos específicos frente al antígeno B nativo en sueros de personas infectadas con otras especies de este mismo género como *E. multilocularis* (Siracusano y cols., 2008) y *E. vogeli* (De la Rue y cols., 2010). Además las subunidades B1 y B2 de *E. granulosus* y de *E. multilocularis* muestran una identidad de secuencias de aminoácidos y nucleótidos superiores al 90% entre ambas especies (95,8% en el caso de la secuencia aminoacídica de la subunidad B2) (Mamuti y cols., 2006; Muzulin y cols., 2008). En un reciente trabajo de Jiang y cols. (2012) se concluye que las subunidades ortólogas del antígeno B de *E. granulosus* y *E. multilocularis* que reconocen anticuerpos específicos podrían ser muy similares. A pesar de estas similitudes, se encuentra una menor respuesta de anticuerpos en suero contra el antígeno B o sus subunidades, en los casos de HA que en los de hidatidosis unilocular. Esto podría atribuirse a las diferencias en la producción, liberación o presentación del antígeno por parte de cada uno de dichos cestodos, que vendrán influenciadas por el crecimiento y desarrollo diferencial de quistes alveolares y uniloculares en pacientes humanos (Mamuti y cols. 2006). Así, los antígenos B son típicamente producidos como proteínas de secreción del quiste, y se consideran componentes mayoritarios del líquido hidatídico. Los quistes uniloculares durante su desarrollo en pacientes, suelen producir LH que contendrá los antígenos B. El diferente desarrollo de los quistes alveolares en pacientes se refleja, entre otros, en que los quistes no presentan una cavidad claramente delimitada en la que se acumule el líquido quístico, sino que el parásito crece infiltrativamente, produciendo tejidos semisólidos y de apariencia estromatosa, lo que probablemente disminuye la proporción de LH y por tanto de antígenos solubles del mismo, entre ellos los antígenos B. Refrendando esta hipótesis, se ha



comprobado que los mejores antígenos recombinantes para diagnosticar la HA son proteínas somáticas parasitarias (ej., el antígeno Em18; Ito y cols., 1993).

En relación a las reacciones positivas frente a los sueros de pacientes con NCC de Perú, podrían deberse a la presencia del antígeno B en cisticercos no calcificados, que mostrarían para el caso de *T. solium* una identidad comprendida entre el 45-50% con los antígenos B de *E. granulosus* (Ferrer y cols., 2007). En este caso, el parásito sí consiste, al igual que un quiste unilocular, en una cavidad generalmente rellena de líquido, conteniendo antígenos solubles propios, como por ejemplo los antígenos B, lo cual podría explicar el mayor porcentaje de reacciones cruzadas en este caso que con los pacientes con HA.

Llama la atención, en cualquier caso, la diferencia en el número de reacciones cruzadas con pacientes con NCC de distinta procedencia, puesto que las reacciones cruzadas con pacientes de Méjico son mucho menores que con pacientes peruanos. En el caso de los sueros de pacientes con NCC de Perú, los sueros habían sido previamente testados en un western blot específico y en otro frente a LH, siendo positivo contra los antígenos B del LH solo uno de los pacientes que dieron lugar a reacción cruzada. No se encontró correlación entre un número mayor de bandas positivas en el western blot específico y la presencia de reactividad cruzada con los recombinantes. Sin embargo, la práctica ausencia de reacciones cruzadas con los pacientes de NCC de Méjico con los antígenos 2B2t y B2t parece indicar la potencial presencia de anticuerpos específicos verdaderos frente a estos antígenos en los pacientes peruanos; es decir, la infección potencial de dichos pacientes con *E. granulosus*. Esta hipótesis se apoya sobre datos epidemiológicos de hidatidosis en Perú y en Méjico, puesto que la prevalencia de hidatidosis en humanos es de 5,5 a 9,1% en zonas endémicas de Perú, de donde proceden los sueros de NCC aquí testados (Moro y cols., 2011), mientras que Méjico tiene una prevalencia de hidatidosis mucho menor que Perú, y los casos autóctonos mejicanos son considerados como raros (Mata-Miranda y cols., 2007). Otra razón podría ser las características clínicas de los pacientes en cada panel de sueros, ya que un menor número de reacciones cruzadas podrían atribuirse a la inactividad parasitaria por calcificación de los cisticercos o a un menor número de cisticercos en cada paciente

(Ferrer y cols., 2007). Desafortunadamente, los datos acerca del estado parasitario tanto en pacientes peruanos como mejicanos no estaban disponibles.

En definitiva, las reacciones cruzadas detectadas contra los recombinantes conciernen a pacientes con HA en un porcentaje mucho menor que al utilizar antígenos nativos, lo cual introduce una mejora clara con respecto al uso de los mismos. En cuanto a las reacciones cruzadas con pacientes con NCC, y puesto que los datos obtenidos aquí no son totalmente concluyentes, sería recomendable testar los recombinantes con un mayor número de sueros de pacientes con NCC, tanto de áreas endémicas para hidatidosis como de áreas no endémicas, utilizando cohortes de pacientes con características clínicas bien definidas.

Los pacientes con teniosis (*T. solium*) también dieron lugar a un porcentaje de reacciones cruzadas con los recombinantes. Los antígenos B están también presentes en oncosferas, y los pacientes provienen de un área endémica para hidatidosis, por lo que esas reacciones cruzadas se podrían explicar siguiendo un razonamiento similar al que se ha expuesto para los pacientes peruanos con NCC. Ya que el número de pacientes con teniosis testado aquí fue bajo, sería recomendable evaluar estas reacciones cruzadas con un número mayor de pacientes con esta parasitosis.

En general el antígeno B2t mostró menor número de reacciones cruzadas que el 2B2t. Además de los motivos expuestos, que se refieren a una mayor “sensibilidad” potencial del antígeno 2B2t también con estos pacientes –bien por similitudes antigénicas de las otras especies con *E. granulosus*, bien por la hiperendemicidad para la hidatidosis de algunas regiones de las que proceden los pacientes con otras parasitosis-, el motivo podría ser el mayor número de unidades antigénicas repetidas en el tándem 2B2t, que como se ha mencionado podría resultar en una menor especificidad que para antígenos de una sola unidad (ej. Goto y cols., 2010).

En cuanto al grupo de sueros de pacientes con hepatitis y de donantes sanos, para ambos antígenos encontramos un total de dos falsos positivos, siendo uno de ellos también positivo a la HAI. En el caso del paciente con hepatitis que resultó positivo, el título fue relativamente elevado para ambos recombinantes, mientras que en el caso de los donantes sanos, la reactividad cruzada se detectó para dos personas diferentes en cada recombinante, con títulos relativamente bajos. Estos falsos

positivos, al tratarse de pacientes que viven en un área endémica para la hidatidosis (Salamanca), podrían indicar un contacto potencial con el parásito que diese lugar a respuestas inmunes específicas. Especialmente llamativo en este aspecto es el positivo del paciente con hepatitis, que también resultó positivo en el kit de HAI, que es la técnica más específica de las testadas aquí.

La HAI resultó ser un test muy específico con todos los grupos de sueros, aunque mostró un número muy elevado de reacciones cruzadas con pacientes con HA. Este kit utiliza una fracción purificada del antígeno 5. Este antígeno ha sido descrito también en otros ténidos (*T. solium* GenBank HQ393478.1 y *T. asiatica* GenBank EF420507.1) y está presente, además de en el fluido del cisticerco, en oncosferas, presentando actividad proteolítica (Rueda y cols., 2011). El antígeno 5 es muy similar entre *E. granulosus* y *T. solium*, lo que sugiere la potencial presencia de una molécula homóloga también en *E. multilocularis*, que aún no se ha descrito. Esta molécula podría ser producida por el metacestodo de dicha especie para potenciar su carácter infiltrativo en pacientes con HA, dada su actividad proteolítica. Su producción podría explicar las reacciones cruzadas con pacientes con HA que se han detectado en este trabajo al utilizar el kit de HAI. Sin embargo, también se deben tener en cuenta otros factores como posible explicación a esas reacciones cruzadas, como la presencia de moléculas adicionales que sean comunes a ambos parásitos en la fracción purificada del LH que utiliza este kit.

El porcentaje de reacciones cruzadas del kit de HAI detectadas aquí es más elevado que el señalado por otros autores y por el propio distribuidor, que da una especificidad global del 94,4% para el kit. Estos valores han sido calculados, sin embargo, con una escasa (o ninguna) representación de sueros de pacientes con parasitosis relacionadas, y más concretamente con HA (van Doorn y cols., 2007; manual del kit Hydatidose Fumouze).

La reactividad cruzada de los antígenos utilizados habitualmente para el diagnóstico serológico de la hidatidosis unilocular con la HA es un serio inconveniente para el diagnóstico específico de la hidatidosis en las zonas donde ambos parásitos coexisten (Carmena y cols., 2006; Brunetti y cols., 2010). A este respecto, la capacidad del nuevo antígeno 2B2t para discriminar entre los pacientes

con hidatidosis unilocular o alveolar es notablemente superior a la mostrada por los antígenos nativos.

En cuanto a las cifras de sensibilidad, la más alta fue la obtenida con el ELISA-2B2t (87,6%), seguida por el ELISA-LH y ELISA-B2t (83,3% y 79%, respectivamente), estando todas ellas muy por encima de la sensibilidad calculada para el kit de HAI (34,9%). Estas diferencias podrían ser parcialmente atribuidas a la mayor sensibilidad de la técnica ELISA frente a la técnica de HAI (ej. Liance y cols. 2000; Ortona y cols., 2000; Sbihi y cols. 2001), así como a los diferentes antígenos usados, ya que ha sido demostrado que el antígeno B presenta una mayor reactividad que el antígeno 5 (Barbieri y cols. 1998). En cualquier caso, los ensayos realizados durante esta Tesis han demostrado que el kit de Fumouze basado en la HAI presenta una sensibilidad mucho menor que la indicada por el proveedor comercial (93%). Otros autores ya han detectado valores de sensibilidad diferentes a los dados por la casa comercial para este mismo kit, algunos elevados (Liance y cols., 2000; Van Doorn y cols., 2007) y otros bajos (Force y cols., 1992), siendo el más comparable al nuestro, por número de pacientes y características clínicas de los mismos, así como por la aproximación experimental (tipo de placas utilizadas), el de Gonlugur y cols. (2005). Este estudio arroja un 55,8% de sensibilidad para este kit, utilizando los sueros de 120 pacientes con hidatidosis, un porcentaje un poco mayor que el que encontramos aquí, probablemente debido a que estos autores utilizaron un valor de corte menor al nuestro.

### 6.2.3. INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La variabilidad en la sensibilidad dada por distintos laboratorios en el caso de este kit de HAI también se da cuando otras técnicas y antígenos, entre ellos el LH y el antígeno recombinante B2, han sido ensayados por distintos grupos. Específicamente, para el antígeno B2 recombinante en ELISA-IgG, los datos de sensibilidad varían del 45% al 93% (Carmena y cols., 2006), siendo los más similares a los nuestros los obtenidos por Rott y cols., (2000) y Virginio y cols., (2003). Estas grandes diferencias se pueden atribuir a distintas variables clínicas que muchas veces no son explicitadas. Estas variables podrían afectar a la sensibilidad del test por estar condicionando el

nivel de anticuerpos circulantes específicos (Moro y Schantz, 2009). Esto se ha demostrado para alguna de las variables, entre ellas la fecha de recogida del suero en relación con el inicio del tratamiento ya sea farmacológico o quirúrgico, ya que ambos pueden conducir a un aumento en el nivel de anticuerpos específicos (ej. Feng y cols., 2010), el estadio quístico según la clasificación dada por la OMS (ej. Li y cols., 2010), la localización quística (ej. Babba y cols., 1994) y el número de quistes (ej. Ortona y cols., 2000; Gavidia y cols., 2008).

Tal y como acabamos de mencionar, en muchas ocasiones la información acerca de los pacientes es muy incompleta, dándose solo la descripción de una o dos variables clínicas, que en algunos casos ni siquiera se tienen en cuenta en los cálculos de la sensibilidad de la prueba que se evalúa (ej. Virginio y cols., 2003; Feng y cols., 2010). A estas deficiencias se añade muchas veces el hecho de que el número de sueros que representa a cada grupo a estudiar es muy escaso, dando lugar a resultados poco significativos (ej. Cohen y cols., 1998, Sbihi y cols., 2001; Sunita y cols., 2007; Delunardo y cols., 2010).

Estas diferencias indican, en cualquier caso, la necesidad de llegar a un consenso para determinar las variables que hay que comprobar cuando se quiere evaluar una herramienta de serodiagnóstico para la hidatidosis. Además, lo más apropiado es utilizar las mismas muestras para comparar diferentes herramientas serológicas (Junghanss y cols., 2008)

Aquí, hemos examinado la influencia de seis variables clínicas en el resultado de los diferentes tests que se han utilizado: el número, localización y estadio quístico, la presencia de complicaciones, los antecedentes de hidatidosis, y la fecha de recogida de suero (en comparación a la de inicio del tratamiento). En cuanto a la clasificación quística, ya que el número de muestras de esta cohorte para algunos tipos de quistes era demasiado bajo para el análisis estadístico (44 pacientes con CE1, 22 pacientes con CE2, 8 pacientes con CE3 y 2 pacientes con CE4), especialmente los pertenecientes al grupo de quistes inactivos (CE4-CE5), no pudimos agrupar a los pacientes con quistes activos, transcionales e inactivos por separado, en el intento de relacionar la actividad quística con el resultado de la serología correspondiente. En este sentido, el cambio de quistes activos a quistes inactivos se ha demostrado que resulta en una disminución de anticuerpos específicos contra el antígeno B

recombinante (ej. Li y cols., 2011). También en relación con esto, la expresión de la subunidad B2 se ha demostrado que se reduce con la senescencia del quiste (Pan y cols., 2011). Por lo tanto, y tras esta primera aproximación, decidimos que los antígenos debían ser testados con un mayor número de sueros que incluyesen proporcionalmente un número significativo de quistes activos, transicionales e inactivos.

En cualquier caso, también se ha demostrado que los quistes CE1 se asocian más frecuentemente con una respuesta seronegativa frente a antígenos del parásito, incluyendo el antígeno B, en contraste con los CE2 y CE3 que se asocian generalmente con una respuesta de anticuerpos específica detectable (ej. Li y cols., 2010 y 2011). Por lo tanto, se decidió agrupar a estos pacientes en dos grupos: CE1 y CE2 a CE4, y determinar si los resultados de las pruebas dependían de esta variable.

Todas las variables estudiadas aquí, excepto una, influyeron en la sensibilidad del ELISA-LH, como se observa por el análisis de chi cuadrado. Se observó un resultado muy similar con la prueba de HAI comercial. El ELISA-B2t fue influenciado por el número de quistes y la fecha de recogida de suero (en cuanto a la fecha del tratamiento), mientras que el ELISA-2B2t fue influenciado solo por el número de quistes.

Sorprendentemente, los pacientes con quistes pulmonares fueron más frecuentemente positivos con el kit de HAI y el ELISA-LH que los pacientes con quistes en el hígado. Esto contradice los resultados de otros autores, que mostraron que los quistes pulmonares por lo general resultan en una estimulación antigénica menor que los quistes en hígado (ej. Babba y cols., 1994) No obstante, estas diferencias pueden en nuestro caso atribuirse a la influencia de otras variables clínicas. En nuestro grupo de pacientes, el 66% de los quistes pulmonares presentaban complicaciones, en comparación con el 27% de quistes complicados en hígado, en ambas localizaciones con un porcentaje similar de cualquiera de los dos tipos de complicaciones que se observaron (ruptura e infección quística). Así, la presencia de quistes complicados en particular, podrían influir en los resultados de la prueba dando lugar a seropositividad más frecuentemente que los quistes no complicados, independientemente de su localización. Para comprobar esta hipótesis,

se estudió la influencia en conjunto de todas las variables estudiadas mediante análisis de regresión logística.

Los resultados de este análisis indicaron que cuatro y tres de las seis variables afectan el resultado del kit de HAI y del ELISA-LH, respectivamente, en asociación o no con las otras variables. Los resultados del ELISA-B2t fueron influenciados por el número de quistes. Así, un paciente con un quiste único es más probable que de lugar a un resultado negativo con B2t que un paciente con quistes múltiples. Por otro lado, el rendimiento del ELISA-2B2t fue estadísticamente independiente de todas las variables clínicas evaluadas. Así, el porcentaje de pacientes 2B2t negativos con hidatidosis confirmada podría atribuirse a la ausencia de anticuerpos específicos asociada con variables no evaluadas en esta cohorte, ya sean clínicas o de otro tipo, como por ejemplo la formación de complejos inmunes.

No obstante, la inclusión de un mayor número de pacientes podría resultar en una asociación estadísticamente significativa para algunas de las variables de la prueba, especialmente para aquellas en las que se encontró un intervalo de confianza amplio.

Con esta cohorte de pacientes, nuestros resultados sugieren que los quistes múltiples, la localización en el hígado, la presencia de quistes CE2 o CE3 y la recogida del suero después de un tratamiento, son variables que aumentan la probabilidad de un resultado positivo en el ELISA-2B2t. Esto es sugerido también por las características mayoritarias de los pacientes que resultaron negativos frente a este test (n = 23): el 78% tenían un solo quiste, el 65% tenía quistes pulmonares, el 62,5% tenían quistes tipo CE1 y el 78% de esos sueros había sido recogido antes del tratamiento. Por desgracia, el número de pacientes con serología negativa era demasiado bajo como para extraer conclusiones significativas.

Debido a estos resultados relativamente poco conclusivos estadísticamente, se aumentó el número de pacientes testados, incluyendo 946 sueros de pacientes con hidatidosis confirmada, recogidos en hospitales de Italia y Alemania. En este caso, los datos clínicos no incluyeron información acerca de los antecedentes de hidatidosis, ni de las complicaciones, pero se pudo ampliar el estudio estadístico de la influencia del número de quistes, localización y clasificación quística, así como fecha de recogida del

suero con respecto al tratamiento aplicado en cada caso en cada uno de los tests. El tratamiento estadístico de esta cohorte de datos mostró que, tal y como sugerían, aunque sin significación estadística, los resultados con pacientes peruanos, estas variables clínicas afectan estadísticamente a la positividad de las pruebas serológicas, incluyendo aquellas que se basan en el uso de antígenos recombinantes. La excepción fue la localización quística, que no mostró influenciar los distintos tests, aunque debemos mencionar que el número de sueros de pacientes con quistes hepáticos representaban el 85% de los sueros en esta variable, lo cual podría influir en la significación estadística de esta comparación.

Nuestros estudios demuestran, por tanto, que las diferencias clínicas de cada paciente influirán claramente en la sensibilidad definida para un test de detección de anticuerpos específicos. Es por tanto imprescindible dar los detalles clínicos de los pacientes para poder conocer certeramente el valor diagnóstico de un test determinado. De otro modo, la comparación de nuevas herramientas con las ya descritas y la posible sustitución de herramientas menos efectivas por otras con más valor diagnóstico será inviable.

Nuestros resultados también demuestran que el rendimiento del ELISA-B2t puede ser mejorado mediante el uso de dos unidades en tándem de dicho antígeno.

#### 6.2.4. APLICACIÓN DEL ANTÍGENO 2B2t EN TIRAS INMUNOCROMATOGRÁFICAS

Como hemos mencionado, la hidatidosis es muy prevalente en áreas definidas dentro de países en vías de desarrollo. La falta de recursos para el diagnóstico de pacientes en estos países plantea la necesidad de disponer de métodos diagnósticos y de seguimiento alternativos, con buenas cualidades diagnósticas, fáciles de utilizar y que además resulten en un bajo costo de producción, transporte y manejo. Esto nos motivó a intentar aplicar el nuevo antígeno 2B2t en una técnica con estas características, y más concretamente en inmunocromatografía.

Comenzamos el desarrollo de tiras inmunocromatográficas en colaboración con la empresa Certest Biotec. Estas tiras, que contenían el antígeno 2B2t en las



partículas coloidales y una anti-IgG4 monoclonal sobre la línea test, mostraron una sensibilidad del 41,9% con los pacientes peruanos, sensibilidad mucho menor que la obtenida en ELISA con el mismo antígeno, aunque mayor que con el kit de HAI. Las diferencias de sensibilidad entre los pacientes agrupados según las variables clínicas estudiadas fueron mucho más pronunciadas en general que para el ELISA. La especificidad, sin embargo, se clasificó a la inversa: cuanta mayor sensibilidad, menor especificidad (ELISA-2B2t<tiras-2B2t<HAI).

Todos los positivos en la tira fueron también positivos en ELISA, lo que indicaría una pérdida de sensibilidad en las tiras, potencialmente relacionada con su formato o con la modificación de la afinidad antígeno-anticuerpo en relación a la disponibilidad de epítomos en dicho formato. Además, el tiempo de interacción entre los antígenos y anticuerpos es mucho menor en el caso de las tiras, lo que también puede influir en su sensibilidad relativa con respecto al ELISA.

Sin embargo, no se encontró una correlación directa entre la magnitud del índice serológico en ELISA y el resultado en las tiras. Esto indica que la sensibilidad es menor para algunos pacientes, y su pérdida se relacionaría también con los reactivos que se usaron en las tiras, y no solo con el formato de las mismas o su modo de uso.

Estas tiras, por tanto, no mostraron ventajas con respecto al uso del antígeno 2B2t en ELISA, puesto que perdían una gran parte de la sensibilidad que se conseguía en esta última técnica.

Cuando se compararon las tiras que manufacturamos en Certest con las comercializadas por Vircell, que se basan en el uso de antígenos nativos, estas últimas mostraron una sensibilidad muy superior, aunque una especificidad menor que las de Certest. En general, estos resultados eran esperables, puesto que los antígenos de LH son en general más reactivos que sus unidades recombinantes (Carmena y cols., 2006), tanto para las reacciones específicas como para las inespecíficas. Así ocurre también con el LH utilizado en ELISA, que en comparación al antígeno 2B2t en la misma técnica, da lugar en general a un número mayor de resultados positivos tanto en el grupo de pacientes con hidatidosis como en los otros grupos de sueros.

Puesto que el uso de antígenos nativos presenta una serie de desventajas con respecto al uso de recombinantes, como una menor especificidad y otros, ya

expuestos a lo largo de esta memoria, Vircell se interesó por el antígeno recombinante 2B2t como sustituto potencial de los antígenos nativos en las tiras correspondientes. Las tiras inmunocromatográficas desarrolladas con el recombinante 2B2t en colaboración con Vircell, fueron comparadas con las tiras comercializadas por esta misma empresa.

Mientras que la sensibilidad global fue mayor para las tiras con antígenos nativos, la sensibilidad para pacientes con quistes activos y transicionales fue la misma para ambas tiras (alrededor del 95%), siendo menor la sensibilidad de la tiras con recombinante para los quistes inactivos que la de la tira con antígenos nativos. Esto se explica por el fenómeno de persistencia de anticuerpos frente a antígenos del LH en pacientes curados (en este caso, con quistes inactivos), que quedan en circulación mucho después de desaparecer el estímulo antigénico (ej. Zarzosa y cols. 1999; Bulut y cols., 2001; Doiz y cols., 2002). La especificidad fue mucho mayor para las tiras conteniendo el recombinante, debido a las frecuentes reacciones cruzadas del LH, que se evitan al utilizar recombinantes (ej. Virginio y cols., 2003; Sbihi y cols., 2003).

Al igual que para el ELISA-2B2t, encontramos que todas las variables clínicas estudiadas con respecto a las positividad de la técnica influyen en la misma para las tiras con 2B2t, excepto la localización quística. Sin embargo, a pesar de estar influenciadas por la clínica, las tiras 2B2t se mostraron mucho más sensibles que el ELISA con el mismo antígeno. Uno de los factores que podría explicar esta mayor reactividad específica es el hecho de que en las tiras estamos detectando todos los isotipos de anticuerpos frente al 2B2t que se encuentren en el suero problema, mientras que en el ELISA solo detectamos las IgGs. Otros factores indirectamente relacionados con la reacción antígeno-anticuerpo podrían también diferenciar estas dos técnicas en cuanto a su reactividad comparada.

Aunque las reacciones cruzadas con pacientes con HA son mayores en la tira 2B2t que en el ELISA-2B2t, demostramos, en cualquier caso, que las tiras desarrolladas en colaboración con Vircell son mucho más eficientes en el diagnóstico de la hidatidosis y presentan por tanto ventajas en esta aplicación con respecto a cualquiera de los otros tests que hayamos estudiado a lo largo de esta Tesis, incluyendo el ELISA-LH, ELISA-B2t, ELISA-2B2t, HAI de Fumouze, tiras 2B2t

desarrolladas en Certest y tiras VIRapid®HYDATIDOSIS. Es importante señalar que, en cualquier caso, su sensibilidad dependerá de ciertas variables clínicas.

### 6.3. SEGUIMIENTO DE LA HIDATIDOSIS

Como ya hemos mencionado, el abordaje del seguimiento de pacientes con hidatidosis es también una cuestión aún no resuelta. Las cuatro alternativas de manejo clínico (cirugía, drenaje percutáneo, quimioterapia con benzimidazoles y *watch and wait*) requieren la realización de un seguimiento, que permita evaluar su éxito o fracaso (Carmena y cols., 2007; Frider y Larrieu. 2010). Ya se han comentado los problemas inherentes a la utilización de técnicas de imagen para el seguimiento (problemas para detectar alteraciones mínimas en las membranas hidatídicas y la degeneración de la capa germinal –relapsos-, y dificultades para la detección de nuevos quistes de pequeño tamaño –recidivas- (Rigano y cols., 2002; Rogan y cols., 2006; Ben Nouir y cols., 2009; Tamarozzi y cols., 2010; Frider y Larrieu, 2010). Estos problemas se han intentado resolver utilizando técnicas de detección de antígenos o de anticuerpos. Sin embargo, la detección de antígenos es muy poco sensible, y los anticuerpos frente a mezclas antigénicas como el LH permanecen largo tiempo tras la curación, siendo malos indicadores de la misma.

En algunos casos, la presencia de isotipos y sub-isotipos determinados frente a LH o algunos de sus antígenos purificados parece estar relacionada con la actividad o inactividad quística, habiéndose postulado en algunos casos su utilidad como marcadores en seguimiento, aunque con limitaciones debido al porcentaje de pacientes que presenta determinados isotipos/sub-isotipos específicos (Carmena y cols., 2007). La detección de ciertas citocinas parece también en algunos casos presentarse como una alternativa para el seguimiento de pacientes (Carmena y cols., 2007), aunque su utilidad es cuestionada y su aplicación rutinaria también (Tamarozzi y cols., 2010; Piccoli y cols., 2012).

Los avances realizados en la caracterización de alternativas utilizando antígenos recombinantes han sido limitados hasta el momento, definiéndose en muchas ocasiones estas nuevas alternativas de forma parcial, debido a las limitaciones en la batería de sueros y el tipo de información clínica de los pacientes y

su clasificación en cada uno de los estudios realizados. Por tanto, si nos referimos a la aplicación rutinaria de tests alternativos o complementarios a las técnicas de imagen, para la detección inequívoca de curación o de una buena evolución en los pacientes con hidatidosis tratados, encontramos que esta aún no se ha alcanzado.

Ya que el antígeno B, tanto en su forma recombinante (B2t) como en su forma nativa, había mostrado buen potencial para ser utilizado en la detección de la disminución de los anticuerpos específicos frente al mismo, motivada por la curación en pacientes tratados quirúrgicamente (Hernández-González y cols., 2008; Ben Nour y cols., 2008a), decidimos realizar una caracterización más completa de nuestro nuevo antígeno recombinante 2B2t en cuanto a su utilidad para el seguimiento de pacientes con hidatidosis.

Ya que cada una de las alternativas de manejo clínico (cirugía, aspiración, tratamiento farmacológico y *watch and wait*) se relaciona con situaciones evolutivas diferentes, que un antígeno determinado resulte aplicable en el seguimiento de ciertos manejos clínicos, no indica que sea también aplicable a los demás. Por eso, decidimos evaluar la utilidad del antígeno 2B2t en el seguimiento de pacientes, en comparación con el B2t y el LH, con un número representativo de sueros procedentes de pacientes, que hubiesen sido sometidos a cualquiera de las cuatro alternativas de manejo clínico que acabamos de mencionar. Todos fueron seguidos por ultrasonografía durante todo el período estudiado.

### 6.3.1. SEGUIMIENTO TRAS CIRUGÍA O UNA TÉCNICA DE ASPIRACIÓN

En el caso de pacientes sometidos a cirugía o aspiración, se compararon aquellos que no presentaron recidivas o relapsos (curados) con aquellos que sí los presentaron. Encontramos que los anticuerpos frente a los recombinantes sufrían un descenso notable en pacientes curados, más acusado que en el caso del LH, llegando un porcentaje de estos pacientes a negativizar durante el seguimiento, mientras que los no curados mantuvieron títulos elevados a lo largo del seguimiento.

La evolución con respecto al LH es similar a la mencionada por nosotros y por otros autores (ej., Hernández-González y cols., 2008; Ben Nour y cols., 2008a), que

con un grupo de pacientes curados tras cirugía observan que la disminución en la seropositividad con el LH es muy lenta, llegando muy pocos pacientes a negativizar, incluso más de tres años después de la curación, con niveles de anticuerpos que se mantienen elevados por largos períodos de tiempo de manera similar a los no curados (Ben Nouir y cols., 2008a). Nuestros resultados muestran de nuevo que el LH tiene una utilidad muy limitada en el seguimiento de pacientes tras una cirugía, y además demuestran que presenta las mismas limitaciones para el seguimiento de pacientes sometidos a aspiración. No planteamos la posibilidad de detectar sub-isotipos frente a este antígeno, puesto que aunque algunos de ellos han mostrado tendencias más claras a negativizar que otros en pacientes curados, su detección está limitada a aquellos pacientes que presentan respuestas de dichos sub-isotipos, por lo que esta aproximación sería aplicable solo a un número escaso de pacientes (Carmena y cols., 2007).

En el caso de los dos recombinantes, la tendencia en la disminución de anticuerpos específicos en pacientes curados es clara, y muy similar para ambos, aunque el número de pacientes negativos frente al antígeno 2B2t al final del seguimiento es menor que en el caso del antígeno B2t, probablemente debido a valores más elevados en general de IS frente al primero, al inicio del seguimiento. La utilidad del antígeno B (nativo y B2t recombinante) para el seguimiento de pacientes curados tras cirugía ya se había señalado anteriormente (Hernández-González y cols., 2008; Ben Nouir y cols., 2008a), así como la persistencia de reactividad frente al mismo en su forma nativa en pacientes con recidivas (Ben Nouir y cols., 2008a), en períodos de seguimiento muy similares a los estudiados aquí. Con estos resultados, demostramos además que los recombinantes B2t y 2B2t son potencialmente útiles para el seguimiento de pacientes curados tras aspiración o cirugía, y que los anticuerpos específicos frente a los mismos persisten en pacientes con recidivas y relapsos.

También se ha detectado una disminución progresiva del nivel de anticuerpos específicos en pacientes curados tras cirugía, frente al antígeno recombinante denominado recP29, procedente de protoescolices (Ben Nouir y cols., 2009). Sin embargo, su aplicabilidad está claramente limitada, puesto que un alto porcentaje de pacientes con hidatidosis (alrededor del 40%) no presentará nunca anticuerpos

frente al mismo, debido a la ausencia de protoescólices o a una presencia limitada de los mismos en los quistes (Ben Nouir y cols., 2008b, 2009). En el caso de los antígenos B2t y 2B2t, la sensibilidad diagnóstica que se ha mostrado aquí para pacientes con quistes activos y transicionales, que son los sometidos a estos tratamientos, es mucho mayor que la que muestran dichos autores para el recombinante P29, por lo que la utilidad de los recombinantes aquí desarrollados para el seguimiento, en este aspecto, es también mayor que la del P29.

Tal y como mencionamos, el antígeno 2B2t también ha sido aplicado en tiras inmunocromatográficas durante este trabajo. Las tiras 2B2t-Vircell también se evaluaron en cuanto a su utilidad para el seguimiento de la hidatidosis, en comparación a las tiras Vircell originales que contenían antígenos nativos. En este caso, solo se investigó esta aplicación en pacientes tratados por cirugía o aspiración, por limitaciones en las cantidades de suero en el caso de los otros grupos de seguimiento.

Las tiras recombinantes mostraron tendencia a la negativización con todos los pacientes curados con los cuales también se encontró una tendencia a la negativización en el ELISA-2B2t, a diferencia de las tiras con antígenos nativos, que no mostraron tendencia a la negativización con 3 de estos pacientes. Así mismo, la tira con 2B2t mostró negativizarse en 9 de 19 pacientes curados, comparado con 12 de 19 para el mismo antígeno en ELISA y 5 de 19 para las tiras conteniendo los antígenos nativos. El grupo de pacientes no curados mantuvo su reactividad en las tiras con 2B2t a lo largo de todo el seguimiento. Esto indica que el antígeno 2B2t en este test basado en la inmunocromatografía, también podría aplicarse al seguimiento de pacientes tratados quirúrgicamente o por aspiración, indicando su curación de forma muy similar que el mismo antígeno en ELISA.

### 6.3.2. SEGUIMIENTO TRAS TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

En el caso de aquellos pacientes a los que se les aplicó un tratamiento exclusivamente farmacológico o que se sometieron a *watch and wait*, se definió como buena evolución aquella en la que se observaba un cambio de estadio quístico,

llegando a estados inactivos (CE4 o CE5). Si no se alcanzaba un estado parasitario inactivo, se consideró que el paciente no había mostrado evolución.

En el caso de pacientes sometidos a tratamiento farmacológico, los resultados en cuanto a evolución de anticuerpos específicos a lo largo del tiempo post-tratamiento, son comparables a los obtenidos para pacientes tratados con cirugía o con aspiración y curados. Se observa una disminución en el nivel de anticuerpos para los pacientes con buena evolución, mucho más marcada en el caso de los anticuerpos frente a los dos antígenos recombinantes que frente al LH. A diferencia de los pacientes del grupo anterior, éstos presentan una tendencia a la disminución, en el caso de buena evolución, muy similar para los dos recombinantes. Además, el porcentaje de negativización es muy parecido para los dos recombinantes en todos los intervalos de tiempo post-tratamiento en pacientes con buena evolución. Esto indica que ambos recombinantes son igualmente útiles para el seguimiento de este subgrupo de pacientes.

Los pacientes sin evolución a estadios inactivos mantuvieron sus niveles de anticuerpos frente al LH. Sin embargo, se observó una ligera disminución de este nivel frente a los dos recombinantes, acompañada de la negativización de un 10-15% de los sueros tras más de tres años desde el último tratamiento. El aumento de los porcentajes de sensibilidad para estos recombinantes observados aquí en sueros de pacientes sometidos a tratamiento, en comparación con los que no han recibido ningún tratamiento, podría explicar la pérdida paulatina de anticuerpos en pacientes a los que se administra albendazol durante un período limitado, y en los cuales se discontinúa ese tratamiento durante un período prolongado. Así, la administración de albendazol, en este caso, provoca daños en la pared quística, que se traducirían en la exposición de una mayor cantidad de antígenos del interior del quiste, en este caso los antígenos B, resultando en un aumento del nivel de anticuerpos frente a los mismos. La discontinuación del tratamiento podría resultar, a tiempos prolongados, en la “reparación” de esos daños en la pared quística, lo que disminuiría la salida de antígenos, haciendo que el nivel de anticuerpos bajase por falta de estímulo antigénico. La observación de que la seropositividad está influida por el tratamiento ya se ha hecho, como comentamos antes, por otros autores (ej. Li y cols., 2011). Por tanto, la negativización serológica en pacientes que han sido tratados con fármacos

no indica por si sola una buena evolución, puesto que puede atribuirse también a la discontinuación de dicho tratamiento.

Los estudios realizados por varios autores acerca de la utilidad de otros antígenos recombinantes en el seguimiento de pacientes tratados con benzimidazoles son muy limitados. Estos otros autores, además, clasifican los pacientes no en cuanto al tiempo transcurrido tras el tratamiento, sino en cuanto al tipo de quiste que presentan, sin indicar una evolución real. En algunos otros casos, solo se comentan los resultados serológicos en cuanto al tipo de quiste, sin indicar si sueros anteriores de esos mismos pacientes en estadios quísticos menos evolucionados resultaron positivos o negativos.

Así, el antígeno recombinante Eg19 descrito por Delunardo y cols. (2010), se testó para el seguimiento de pacientes tras tratamiento farmacológico, aunque en un número muy limitado (cinco casos y 15 sueros, de los cuales dos presentaron buena evolución y tres no evolucionaron), siendo los tiempos post-tratamiento investigados muy alejados (0, 4 y >4 años). Según estos autores, los anticuerpos frente al Eg19 se mantuvieron en pacientes sin evolución, mientras que negativizaron a tiempos >4 años tras el comienzo del tratamiento en los que presentaron buena evolución. El antígeno, además, se evaluó con respecto a su uso en diagnóstico, presentando una sensibilidad extremadamente limitada (10%).

La proteína recombinante HSP20 fue utilizada para el seguimiento de 20 pacientes, de los cuales 6 habían sido sometidos a quimioterapia; de ellos, 4 presentaron buena evolución, en paralelo a una negativización de anticuerpos frente a este antígeno en inmunoblot (Vacirca y cols., 2011). Estos autores no especifican el tiempo de seguimiento, puesto que solo se recogen dos sueros por pacientes: uno antes del tratamiento y otro después, sin detallar el tiempo transcurrido. Además, el uso del recombinante en inmunoblot sugiere que éste es insoluble, limitando su aplicabilidad.

Un estudio un poco más completo es el realizado por Li y cols. en 2011. En este trabajo utilizan el antígeno recombinante rAgB1 en ELISA para el seguimiento de pacientes durante el tratamiento con albendazol. En los pacientes que mostraron curación (paso de un estadio CE1-2-3 a CE4-5) se observó un progresivo declinar del



nivel de anticuerpos específicos frente a este antígeno. Sin embargo, a pesar de esta tendencia a la disminución, ninguno de los pacientes curados llegó a negativizar durante el período de seguimiento.

Vemos, por tanto, que los estudios de otros recombinantes en cuanto a su aplicabilidad en el seguimiento de pacientes tratados con benzimidazoles son muy escasos y presentan serias limitaciones que impiden extraer conclusiones acerca de la utilidad de dichos antígenos en este contexto.

En nuestro caso, la aplicabilidad del los recombinante B2t y 2B2t en el seguimiento de pacientes tratados farmacológicamente se muestra más clara, aunque su utilización debería ser en este caso siempre conjunta con una técnica de imagen. Esto es porque, aunque la bajada de anticuerpos específicos es clara para pacientes con buena evolución, esta bajada también se puede presentar tras la discontinuación del tratamiento a tiempos prolongados. A diferencia del seguimiento de estos pacientes, la curación de aquellos sometidos a cirugía o aspiración podría ser potencialmente predicha por su disminución o negativización de los anticuerpos específicos frente a ambos recombinantes.

Es también importante mencionar que la imagen *per se* tampoco sería indicativa de curación en algunos casos de pacientes tratados farmacológicamente, y más concretamente refiriéndonos a aquellos que evolucionan hasta estadios CE4, puesto que se ha mencionado por varios autores que existe la posibilidad de que se produzca su regresión a quistes transicionales tras la discontinuación del tratamiento (ej., Stojkovic y cols., 2009; Zhang y cols., 2011). Esta ha sido una observación también realizada aquí, sobre tres pacientes que presentaron una regresión desde quistes tipo CE4 a quistes transicionales, cuando el tratamiento finalizó, manteniendo estos pacientes la seropositividad frente a los antígenos aquí ensayados durante todo el período de seguimiento. En este sentido, la serología positiva frente al antígeno 2B2t de forma mantenida, en pacientes tratados farmacológicamente y con imágenes tipo CE4, podría ser indicativa de actividad parasitaria.

### 6.3.3. SEGUIMIENTO *WATCH AND WAIT*

Debido a las evidencias que muestran que una gran proporción de los quistes sigue una evolución natural y espontánea hacia la calcificación, y que ya calcificados van a ser estables y se mantendrán así (Rogan y cols., 2006), una proporción de pacientes, generalmente que no presentan complicaciones o síntomas, son seguidos por *watch and wait* (Junghanss y cols., 2008). En este caso, la evolución será más lenta que en el caso de aplicar un tratamiento, por lo que los períodos de seguimiento deben ser prolongados (de al menos 10 años; Rogan y cols., 2006; Junghanss y cols., 2008). En nuestro estudio, estos tiempos no fueron tan prolongados en general, y además, debido a las características de este grupo de pacientes, la mayor parte presentaba ya quistes inactivos al inicio del seguimiento. Por estos motivos, estos pacientes fueron clasificados según el estadio quístico para evaluar la utilidad de nuestros antígenos en su seguimiento, considerando aquellos con quistes inactivos como pacientes curados, y los que presentaron quistes activos o transicionales como no curados.

Para el LH se obtuvieron valores altos de IS en quistes activos y transicionales, observándose una bajada de la mediana de estos valores para pacientes con quistes CE4 y CE5, aunque un porcentaje muy alto de estos pacientes presentaron valores de IS positivos contra el LH. En el caso de los antígenos recombinantes, especialmente para el 2B2t, los valores de la mediana del IS en cada uno de los tipos quísticos parecen corresponderse con la “historia natural” del desarrollo quístico, su producción y exposición antigénica, y por tanto su grado de inmunogenicidad. Así, quistes con un contenido todavía bajo de antígenos por su poco grado de desarrollo, y poco inmunogénicos por la limitada salida hacia el hospedador de los mismos debido a la integridad de la pared quística (CE1) dan lugar a IS en general más bajos que para quistes CE2 (más inmunogénicos), aumentando estos valores especialmente para quistes CE3a, que pueden resultar en una mayor estimulación antigénica que los anteriores por daños en la pared quística (especialmente la capa laminar), que dejen salir hacia el hospedador una mayor cantidad de antígenos. Posteriormente, la pérdida de contenido líquido (que incluye los antígenos B) y el comienzo de la degeneración que se observa en quistes CE3b, podría motivar la bajada en la mediana de los valores de IS que observamos frente al antígeno 2B2t. Los quistes inactivos

(CE4 y CE5) darán lugar a una estimulación antigénica mucho menor, tal y como se refleja en las medianas y distribución de los valores de IS anti-2B2t para cada uno de estos grupos. Es importante volver a mencionar que, en relación con esto, la expresión de la subunidad B2 se ha demostrado que se reduce con la senescencia del quiste (Pan y cols., 2011). Es también de mencionar que algunos de los grupos están mucho mejor representados que otros por razones obvias (en pacientes *watch and wait* los más numerosos son aquellos con quistes inactivos).

Las diferencias de estimulación antigénica de los mismos tipos de quistes cuando el paciente es sometido a un tratamiento, son notables. Así se comprueba en nuestro trabajo, en el que la comparación de ISs en cada tipo quístico entre pacientes no tratados y tratados farmacológicamente, muestra claramente que el tratamiento resulta en una mayor estimulación antigénica y por tanto en una proporción de pacientes positivos frente a 2B2t mayor para todos los tipos quísticos. Esto indica que el tratamiento con benzimidazoles resulta en un daño quístico, y potencialmente en una liberación de antígenos mayor cuantitativamente, que se refleja en una mayor estimulación antigénica y un mayor nivel de anticuerpos específicos.

Otros autores han utilizados determinados antígenos recombinantes para comparar la reactividad serológica frente a ellos en pacientes con quistes en distintos grados de desarrollo. Aunque las aplicaciones no se refieren a un seguimiento de pacientes *watch and wait*, estos resultados podrían indicar su utilidad para este tipo de seguimiento. Así se obtienen resultados similares con la subunidad recombinante B1, ya que pacientes con quistes CE4 y CE5 no presentaban anticuerpos específicos frente a este antígeno (Li y cols., 2010). Una tendencia contraria, pero también indicativa de inactividad quística, se observó por Margutti y cols. (1999) para el antígeno recombinante EgEF-1 $\beta/\delta$ .

En el caso de pacientes en *watch and wait*, entonces, nuestros antígenos recombinantes y otros podrían indicar cura solo en el caso de pacientes con imágenes tipo CE5 y serología negativa. En otros casos, y siempre acompañada de una imagen, el resultado serológico puede corresponderse o no con la viabilidad quística. Por tanto, en este tipo de manejo clínico es donde la serología, acompañada o no de una imagen, resulta menos útil para el seguimiento, en comparación con su potencial aplicabilidad en pacientes tratados.

#### 6.4. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS B POR INMUNOCROMATOGRAFÍA

Decidimos aplicar los recombinantes obtenidos para el desarrollo de una tira inmunocromatográfica con potencial aplicación para la detección de antígenos B. A priori, este desarrollo se pensó para aquellos pacientes que presentasen antígenos B circulantes a un nivel detectable por esta técnica, como un complemento a la serología específica, tanto para el diagnóstico como para el seguimiento. Sin embargo, la sensibilidad de esta detección fue muy baja, por lo que no resultó en la detección de antígenos circulantes en los pacientes aquí testados. Además, se encontró que existía reactividad cruzada con antígenos crudos de *E. multilocularis*. La especificidad de estas tiras se circunscribe aparentemente al género *Echinococcus*, mostrando ausencia de reactividad con parásitos del género *Taenia*.

Por tanto, estas tiras podrían ser aplicadas potencialmente a la detección de antígenos B específicos de *Echinococcus*, tanto en muestras quísticas de origen animal como humano, en casos en los que existan dudas acerca de la identidad de dichos quistes. En el caso de animales, el diagnóstico de la hidatidosis se realiza rutinariamente *post-mortem*, por visualización de las lesiones quísticas. Sin embargo, la confirmación de que dichas lesiones sean quistes hidatídicos solo se puede hacer histológicamente (Gatti y cols., 2007). Nuestras tiras podrían sustituir a los exámenes histológicos para esa confirmación.

En el caso de pacientes, para HA estas tiras podrían utilizarse para el diagnóstico confirmatorio en biopsias obtenidas del material parasitario, sin necesidad de recurrir a un procedimiento quirúrgico para su confirmación. En pacientes con hidatidosis unilocular, el material extraído durante un procedimiento quirúrgico o de aspiración podría también servir para confirmar la identidad de dicho material.

## **7. CONCLUSIONES**

---



1. El antígeno recombinante en tándem 2B2t da lugar a un rendimiento de producción dos veces superior al del antígeno recombinante B2t.
2. Las proteínas recombinantes B2t y 2B2t en ELISA son más eficientes para el diagnóstico de pacientes con hidatidosis que el líquido hidatídico en ELISA y el test comercial de hemaglutinación Hydatidose Fumouze, mejorando el 2B2t los resultados con respecto al B2t por su mayor sensibilidad y una especificidad comparable.
3. El resultado de los tests para la detección de anticuerpos específicos en pacientes con hidatidosis, se ve influido por las variables clínicas de los mismos. Es por tanto imprescindible evaluar la influencia de dichas variables, para poder definir el valor diagnóstico de cualquier test serológico.
4. Existe una correlación directa entre la actividad quística detectada por imagen, el número de quistes y la aplicación de tratamiento, y la positividad tanto frente al líquido hidatídico como frente a los antígenos recombinantes B2t y 2B2t.
5. El comienzo de la disminución de los niveles de anticuerpos frente al líquido hidatídico, en pacientes curados o con buena evolución, se produce a tiempos muy prolongados tras el comienzo del seguimiento (más de tres años), por lo que dicho antígeno no resulta útil para determinar la cura ni la evolución de pacientes con hidatidosis.
6. El nivel de anticuerpos frente a los antígenos recombinantes B2t y 2B2t, disminuye rápidamente en pacientes curados tras tratamiento quirúrgico o por aspiración, resultando positivos durante todo el seguimiento aquellos pacientes no curados, por lo que la seronegativización en estos pacientes indica curación.

7. La efectividad del tratamiento farmacológico en pacientes con hidatidosis, correlaciona con una disminución más acentuada y rápida del nivel de anticuerpos frente a los antígenos recombinantes B2t y 2B2t, que la observada cuando el tratamiento no es efectivo. Sin embargo, la existencia de pacientes seronegativos con quistes transicionales y de pacientes seropositivos con quistes inactivos (CE4) que revierten a quistes transicionales, demuestran que ni la serología ni la imagen por separado son indicadores de buena evolución.
8. En el caso de pacientes en *watch and wait*, un resultado negativo frente a los antígenos recombinantes B2t o 2B2t indica curación, solo en el caso de ir acompañado por una imagen tipo CE5.
9. El uso del antígeno recombinante 2B2t en inmunocromatografía, utilizando el formato desarrollado en colaboración con la empresa Vircell S.L., resulta en un producto comercial para el diagnóstico de la hidatidosis humana económico y de uso sencillo, con mayor eficiencia diagnóstica que cualquiera de los otros tests ensayados durante esta Tesis, y con potencial para ser utilizado en el seguimiento de pacientes.
10. La inmunocromatografía para la detección del antígeno B basada en el uso de anticuerpos policlonales frente al antígeno B2t, permite la detección de antígenos B específicos del género *Echinococcus*, por lo que es aplicable al diagnóstico diferencial de lesiones quísticas de otra naturaleza.



## **8. BIBLIOGRAFÍA**

---



- Aslan M, Yüksel P, Polat E, Cakan H, Ergin S, Öner YA, Zengin K, Arıkan S, Saribas S, Torun MM, Kocazeybek B. (2011). The diagnostic value of Western blot method in patients with cystic echinococcosis. *The New Microbiologica* **34**, 173-177.
- Auer H, Stöckl C, Suhendra S, Schneider R. (2009). Sensitivity and specificity of new commercial tests for the detection of specific *Echinococcus* antibodies. *Wiener Klinische Wochenschrift* **121**, 37-41.
- Babba H, Messedi A, Masmoudi S, Zribi M, Grillot R, Ambriose-Thomas P, Beyrouti I, Sahnoun Y. (1994). Diagnosis of human hydatidosis: comparison between imagery and six serologic techniques. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **50**, 64-68.
- Barbieri M, Sterla S, Battistoni J, Nieto A. (1993). High performance latex reagent for hydatid serology using an *Echinococcus granulosus* lipoprotein antigen fraction purified from cyst fluid in one step. *International Journal for Parasitology* **23**, 565-572.
- Barbieri M, Severi MA, Pérez MI, Battistoni J, Nieto A. (1994). Use of specific antibody and circulating antigen serum levels in the hydatid immunodiagnosis of asymptomatic population. *International Journal for Parasitology* **24**, 937-942.
- Barbieri M, Fernández V, González G, Luaces VM, Nieto A. (1998). Diagnostic evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hydatidosis. *Parasite Immunology* **20**, 51-61.
- Ben Nour N, Nuñez S, Frei E, Gorcii M, Müller N, Gianinazzi C, Mekki M, Nouri A, Babba H, Gottstein B. (2008a). Post-surgical follow-up (by ELISA and immunoblotting) of cured versus non-cured cystic echinococcosis in young patients. *Parasitology* **135**, 105-114.
- Ben Nour N, Nuñez S, Gianinazzi C, Gorcii M, Müller N, Nouri A, Babba H, Gottstein B. (2008b). Assessment of *Echinococcus granulosus* somatic protoscolex antigens for serological follow-up of young patients surgically treated for cystic echinococcosis. *Journal of Clinical Microbiology* **46**, 1631-1640.
- Ben Nour N, Gianinazzi C, Gorcii M, Müller N, Nouri A, Babba H, Gottstein B. (2009). Isolation and molecular characterization of recombinant *Echinococcus granulosus* P29 protein (recP29) and its assessment for the post-surgical serological follow-up of human cystic echinococcosis in young patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **103**, 355-364.
- Benabid M, Galai Y, Noura R, Ben Alaya N, Bouratbine A, Aoun K. (2010). ELISA on saliva samples for the detection of anti-hydatid cyst antibodies. *Clinical Laboratory* **56**, 543-546.
- Benito A, Carmena D, Joseph L, Martínez J, Guisantes JA. (2006). Dog echinococcosis in northern Spain: comparison of coproantigen and serum antibody assays with coprological exam. *Veterinary Parasitology* **142**, 102-111.
- Benner C, Carabin H, Sánchez-Serrano LP, Budke CM, Carmena D. (2010). Analysis of the economic impact of cystic echinococcosis in Spain. *Bulletin of the World Health Organization* **88**, 49-57.
- Bowles J, Blair D, McManus DP. (1992). Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular and Biochemical Parasitology* **54**, 165-173.

- Bowles, J., Blair, D. and McManus, D. P. (1994). Molecular genetic characterization of the cervid strain ('northern form') of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* **109**, 215-221.
- Brunetti E, Junghanss T. (2009). Update on cystic hydatid disease. *Current Opinion in Infectious Diseases* **22**, 497-502. Review.
- Brunetti E, Kern P, Vuitton DA; Writing Panel for the WHO-IWGE. (2010). Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Tropica* **114**, 1-16. Review.
- Budke CM, Deplazes P, Torgerson PR. (2006). Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerging Infectious Diseases* **12**, 296-303
- Buishi I, Walters T, Guildea Z, Craig P, Palmer S. (2005). Reemergence of canine *Echinococcus granulosus* infection, Wales. *Emerging Infectious Diseases* **11**, 568-571.
- Bulut V, Ilhan F, Yucel AY, Onal S, Ilhan Y, Godekmerdan A. (2001). Immunological follow-up of hydatid cyst cases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **96**, 669-671.
- Calma CL, Neghina AM, Vlaicu B, Neghina R. (2011). Cystic echinococcosis in the human population of a western Romanian county, 2004-2010. *Clinical Microbiology and Infection* **17**, 1731-1734.
- Carmena D, Benito A, Eraso E. (2006). Antigen for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. *Acta Tropica* **98**, 74-86. Review.
- Carmena D, Benito A, Eraso E. (2007). Recent advances in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **25**, 263-269. Review.
- Carmena D, Sánchez-Serrano LP, Barbero-Martínez I. (2008). *Echinococcus granulosus* infection in Spain. *Zoonoses and Public Health* **55**, 156-165.
- Celik T, Akarsu GA, Güngör C, Colak C, Ormeci N. (2009). Evaluation of antibodies against hydatid cyst fluid antigens in the post-treatment follow-up of cystic echinococcosis patients. *Medical Science Monitor* **15**, CR170-176.
- Chamekh M, Gras-Masse H, Bossus M, Facon B, Dissous C, Tartar A, Capron A. (1992). Diagnostic value of a synthetic peptide derived from *Echinococcus granulosus* recombinant protein. *The Journal of Clinical Investigation* **89**, 458-464.
- Cohen H, Paolillo E, Bonifacino R, Botta B, Parada L, Cabrera P, Snowden K, Gasser R, Tessier R, Dibarboure L, Wen H, Allan JC, Soto de Alfaro H, Rogan MT, Craig PS. (1998). Human cystic echinococcosis in a Uruguayan community: a sonographic, serologic, and epidemiologic study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **59**, 620-627.
- Colli CW, Williams JF. (1972). Influence of temperature on the infectivity of eggs of *Echinococcus granulosus* in laboratory rodents. *Journal of Parasitology* **58**, 422-426.
- Craig PS, Nelson GS. (1984). The detection of circulating antigen in human hydatid disease. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **78**, 219-227.
- Craig PS. (1986). Detection of specific circulating antigen, immune complexes and antibodies in human hydatidosis from Turkana (Kenya) and Great Britain, by enzyme-immunoassay. *Parasite Immunology* **8**, 171-188.

- Crețu CM, Codreanu RR, Mastalier B, Popa LG, Cordoș I, Beuran M, Ianulle DA, Simion S. (2012). Albendazole associated to surgery or minimally invasive procedures for hydatid disease--how much and how long. *Chirurgia (Bucur)* **107**, 15-21. Review.
- Daeki AO, Craig PS, Shambesh MK. (2000). IgG-subclass antibody responses and the natural history of hepatic cystic echinococcosis in asymptomatic patients. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **94**, 319-328.
- Dakkak A. (2010). Echinococcosis/hydatidosis: a severe threat in Mediterranean countries. *Veterinary Parasitology* **174**, 2-11.
- Daniel Mwambete K, Ponce-Gordo F, Cuesta-Bandera C. (2004). Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Acta Tropica* **91**, 87-93.
- Del Carpio M, Mercapide CH, Salvitti JC, Uchiumi L, Sustercic J, Panomarenko H, Moguilensky J, Herrero E, Talmon G, Volpe M, Araya D, Mujica G, Calabro A, Mancini S, Chiosso C, Labanchi JL, Saad R, Goblirsch S, Brunetti E, Larrieu E. (2012). Early diagnosis, treatment and follow-up of cystic echinococcosis in remote rural areas in Patagonia: impact of ultrasound training of non-specialists. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **6**, e1444.
- Delunardo F, Ortona E, Margutti P, Perdicchio M, Vacirca D, Teggi A, Sorice M, Siracusano A. (2010). Identification of a novel 19 kDa *Echinococcus granulosus* antigen. *Acta Tropica* **113**, 42-47.
- Devi CS, Parija SC. (2003). A new serum hydatid antigen detection test for diagnosis of cystic echinococcosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **69**, 525-528.
- Díaz A, Ferreira A, Sim RB. (1997). Complement evasion by *Echinococcus granulosus*: sequestration of host factor H in the hydatid cyst wall. *Journal of Immunology* **158**, 3779-3786.
- Doiz O, Benito R, Sbihi Y, Osuna A, Clavel A, Gómez-Lus R. (2001). Western blot applied to the diagnosis and post-treatment monitoring of human hydatidosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **41**, 139-142.
- Doiz O, Benito R, Gil J, Rojas A, Rubio MC, Osuna A. (2002). Pre- and postsurgical detection of IgG, IgM, and IgA specific to hydatidosis by ELISA with purified antigen enriched with the 5/B antigen complex. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **16**, 295-298.
- Eckert J, Deplazes P. (2004). Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clinical Microbiology Reviews* **17**, 107-135. Review.
- Ersfeld K, Gasser RB, Craig PS. (1997). The immunodiagnostic potential of *Echinococcus granulosus* adult-worm antigens in human cystic echinococcosis. *Parasitology Research* **83**, 90-92.
- Feng X, Wen H, Zhang Z, Chen X, Ma X, Zhang J, Qi X, Bradshaw H, Vuitton D, Craig PS. (2010). Dot immunogold filtration assay (DIGFA) with multiple native antigens for rapid serodiagnosis of human cystic and alveolar echinococcosis. *Acta Tropica* **113**, 114-120.
- Ferragut G, Ljungström I, Nieto A. (1998). Relevance of circulating antigen detection to follow-up experimental and human cystic hydatid infections. *Parasite Immunology* **20**, 541-549.

Ferreira HB, Zaha A. (1994). Expression and analysis of the diagnostic value of an *Echinococcus granulosus* antigen gene clone. *International Journal for Parasitology* **24**, 863-870.

Force L, Torres JM, Carrillo A, Buscà J. (1992). Evaluation of eight serological tests in the diagnosis of human echinococcosis and follow-up. *Clinical Infectious Diseases* **15**, 473-480.

Frider B, Larrieu E. (2010). Treatment of liver hydatidosis: how to treat an asymptomatic carrier? *World Journal of Gastroenterology* **16**, 4123-4129.

Gadea I, Ayala G, Diago MT, Cuñat A, Garcia de Lomas J. (2000). Immunological diagnosis of human hydatid cyst relapse: utility of the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot and discriminant analysis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **7**, 549-552.

Gatti A, Alvarez AR, Araya D, Mancini S, Herrero E, Santillan G, Larrieu E. (2007). Ovine echinococcosis I. Immunological diagnosis by enzyme immunoassay. *Veterinary Parasitology* **143**, 112-121.

Gavidia CM, Gonzalez AE, Zhang W, McManus DP, Lopera L, Ninaquispe B, Garcia HH, Rodríguez S, Verastegui M, Calderon C, Pan WK, Gilman RH. (2008). Diagnosis of cystic echinococcosis, central Peruvian Highlands. *Emerging Infectious Diseases* **14**, 260-266.

Gharbi HA, Hassine W, Brauner MW, Dupuch K. (1981). Ultrasound examination of the hydatid liver. *Radiology* **139**, 459-463.

Gocan H, Surd A, Dobrescu I, Pop E. (2010). The role of ultrasonography in albendazole treatment of hydatid liver cyst monitoring in children-three case reports. *Medical Ultrasonography* **12**, 340-344.

Gonlugur U, Ozcelik S, Gonlugur TE, Celiksoz A. (2005). The role of Casoni's skin test and indirect haemagglutination test in the diagnosis of hydatid disease. *Parasitology Research* **97**, 395-398.

González G, Spinelli P, Lorenzo C, Hellman U, Nieto A, Willis A, Salinas G. (2000). Molecular characterization of P-29, a metacestode-specific component of *Echinococcus granulosus* which is immunologically related to, but distinct from, antigen 5. *Molecular and Biochemical Parasitology* **105**, 177-184.

González LM, Daniel-Mwambete K, Montero E, Rosenzvit MC, McManus DP, Gárate T, Cuesta-Bandera C. (2002). Further molecular discrimination of Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Experimental Parasitology* **102**, 46-56.

González-Sapienza G, Lorenzo C, Nieto A. (2000). 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. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 3979-3983.

Goto Y, Carter D, Guderian J, Inoue N, Kawazu S, Reed SG. (2010). Upregulated expression of B-cell antigen family tandem repeat proteins by *Leishmania* amastigotes. *Infection and Immunity* **78**, 2138-2145.

Gottstein B. (1984). An immunoassay for the detection of circulating antigens in human echinococcosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **33**, 1185-1191.

Gottstein B. (1992). Molecular and immunological diagnosis of echinococcosis. *Clinical Microbiology Reviews* **5**, 248-261. Review.

- Gutiérrez MP, Ramírez I, Zarzosa Mdel P, Fernández JM, Dueñas AI, Mantecón MA, Almaraz A, Rodríguez-Recio MJ, Marcos H, Alonso P, Bratos MA, Orduña A, Rodríguez-Torres A; Grupo de Epidemiólogos del Servicio de Epidemiología de la Junta de Castilla y León. (2003). Seroprevalence of infection due to *Echinococcus granulosus* in the population of Castilla and León (Spain). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **21**, 563-567.
- Haag KL, Araújo AM, Gottstein B, Siles-Lucas M, Thompson RC, Zaha A. (1999). Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda; Taeniidae): selfing or outcrossing? *Parasitology* **118**, 63-71.
- Helbig M, Frosch P, Kern P, Frosch M. (1993). Serological differentiation between cystic and alveolar echinococcosis by use of recombinant larval antigens. *Journal of Clinical Microbiology* **31**, 3211-3215.
- Hemphill A, Müller J. (2009). Alveolar and cystic echinococcosis: towards novel chemotherapeutical treatment options. *Journal of Helminthology* **83**, 99-111. Review.
- Hemphill A, Stadelmann B, Scholl S, Müller J, Spiliotis M, Müller N, Gottstein B, Siles-Lucas M. (2010). *Echinococcus* metacestodes as laboratory models for the screening of drugs against cestodes and trematodes. *Parasitology* **137**, 569-587. Review.
- Hernández-González A, Muro A, Barrera I, Ramos G, Orduña A, Siles-Lucas M. (2008). Usefulness of four different *Echinococcus granulosus* recombinant antigens for serodiagnosis of unilocular hydatid disease (UHD) and postsurgical follow-up of patients treated for UHD. *Clinical and Vaccine Immunology* **15**, 147-153.
- Hosch W, Junghanss T, Stojkovic M, Brunetti E, Heye T, Kauffmann GW, Hull WE. (2008). Metabolic viability assessment of cystic echinococcosis using high-field 1H MRS of cyst contents. *NMR in Biomedicine* **21**, 734-754.
- Ito A, Wang XG, Liu YH. (1993). Differential serodiagnosis of alveolar and cystic hydatid disease in the People's Republic of China. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **49**, 208-213.
- Ito A, Ma L, Schantz PM, Gottstein B, Liu YH, Chai JJ, Abdel-Hafez SK, Altintas N, Joshi DD, Lightowlers MW, Pawlowski ZS. (1999). Differential serodiagnosis for cystic and alveolar echinococcosis using fractions of *Echinococcus granulosus* cyst fluid (antigen B) and *E. multilocularis* protoscolex (EM18). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **60**, 188-192.
- Jenkins DJ, Romig T, Thompson RC. (2005). Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp.-a global update. *International Journal for Parasitology* **35**, 1205-1219. Review.
- Jiang L, Wen H, Ito A. (2001). Immunodiagnostic differentiation of alveolar and cystic echinococcosis using ELISA test with 18-kDa antigen extracted from *Echinococcus* protoscoleces. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **95**, 285-288.
- Jiang L, Zhang YG, Liu MX, Feng Z. (2012). Analysis on the reactivity of five subunits of antigen B family in serodiagnosis of echinococcosis. *Experimental Parasitology* **131**, 85-91.
- Junghanss T, da Silva AM, Horton J, Chiodini PL, Brunetti E. (2008). Clinical management of cystic echinococcosis: state of the art, problems, and perspectives. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **79**, 301-311. Review.

- Kanwar JR, Vinayak VK. (1992). The significance of free and immune-complexed hydatid-specific antigen(s) as an immunodiagnostic tool for human hydatidosis. *Journal of Medical Microbiology* **37**, 396-403.
- Kasahara Y, Ashihara Y. (1997). Simple devices and their possible application in clinical laboratory downsizing. *Clinica Chimica Acta* **267**, 87-102.
- Kedra AH, Swiderski Z, Tkach V, Dubinski P, Pawlowski Z, Stephaniak J, Pawlowski J. (1999) Genetic analysis of *Echinococcus granulosus* from humans and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine. A multicenter study. *Acta Parasitologica* **44**, 248-254.
- Kilimcioğlu AA, Ozkol M, Bayindir P, Girginkardeşler N, Ostan I, Ok UZ. (2006). The value of ultrasonography alone in screening surveys of cystic echinococcosis in children in Turkey. *Parasitology International* **55**, 273-275.
- Larrieu E, Frider B, del Carpio M, Salvitti JC, Mercapide C, Pereyra R, Costa M, Odriozola M, Pérez A, Cantoni G, Sustercic J. (2000). Portadores asintomáticos de hidatidosis: epidemiología, diagnóstico y tratamiento. *Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal of Public Health* **8**, 250-256.
- Lavikainen, A., Lehtinen, M. J., Meri, T., Hirvela-Koski, V. and Meri, S. (2003). Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* **127**, 207-215.
- Leggatt GR, McManus DP. (1994). Identification and diagnostic value of a major antibody epitope on the 12 kDa antigen from *Echinococcus granulosus* (hydatid disease) cyst fluid. *Parasite Immunology* **16**, 87-96.
- Lennick M, Haynes JR, Shen SH. (1987). High-level expression of alpha-human atrial natriuretic peptide from multiple joined genes in *Escherichia coli*. *Gene* **61**, 103-112.
- Li J, Zhang WB, Wilson M, Ito A, McManus DP. (2003). A novel recombinant antigen for immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *The Journal of Infectious Diseases* **188**, 1951-1960.
- Li J, Zhang WB, McManus DP. (2004). Recombinant antigens for immunodiagnosis of cystic echinococcosis. *Biological Procedures Online* **6**, 67-77.
- Li T, Ito A, Chen X, Sako Y, Qiu J, Xiao N, Qiu D, Nakao M, Yanagida T, Craig PS. (2010). Specific IgG responses to recombinant antigen B and Em18 in cystic and alveolar echinococcosis in China. *Clinical and Vaccine Immunology* **17**, 470-475.
- Li T, Ito A, Pengcuo R, Sako Y, Chen X, Qiu D, Xiao N, Craig PS. (2011). Post-treatment follow-up study of abdominal cystic echinococcosis in tibetan communities of northwest Sichuan Province, China. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **5**, e1364.
- Liance M, Janin V, Bresson-Hadni S, Vuitton DA, Houin R, Piarroux R. (2000). Immunodiagnosis of *Echinococcus* infections: confirmatory testing and species differentiation by a new commercial Western Blot. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 3718-3721.
- Lightowlers MW, Liu DY, Haralambous A, Rickard MD. (1989). Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **37**, 171-182.



- List C, Qi W, Maag E, Gottstein B, Müller N, Felger I. (2010). Serodiagnosis of *Echinococcus* spp. infection: explorative selection of diagnostic antigens by peptide microarray. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **4**, e771.
- Liu D, Rickard MD, Lightowlers MW. (1993). Assessment of monoclonal antibodies to *Echinococcus granulosus* antigen 5 and antigen B for detection of human hydatid circulating antigens. *Parasitology* **106**, 75-81.
- Lorenzo C, Ferreira HB, Monteiro KM, Rosenzvit M, Kamenetzky L, García HH, Vasquez Y, Naquira C, Sánchez E, Lorca M, Contreras M, Last JA, González-Sapienza GG. (2005a). Comparative analysis of the diagnostic performance of six major *Echinococcus granulosus* antigens assessed in a double-blind, randomized multicenter study. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 2764-2770.
- Lorenzo C, Last JA, González-Sapienza GG. (2005b). The immunogenicity of *Echinococcus granulosus* antigen 5 is determined by its post-translational modifications. *Parasitology* **131**, 669-677.
- Mamuti W, Yamasaki H, Sako Y, Nakao M, Xiao N, Nakaya K, Sato N, Vuitton DA, Piarroux R, Lightowlers MW, Craig PS, Ito A. (2004). Molecular cloning, expression, and serological evaluation of an 8-kilodalton subunit of antigen B from *Echinococcus multilocularis*. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 1082-1088.
- Mamuti W, Sako Y, Nakao M, Xiao N, Nakaya K, Ishikawa Y, Yamasaki H, Lightowlers MW, Ito A. (2006). Recent advances in characterization of *Echinococcus* antigen B. *Parasitology International* **55**, S57-62. Review.
- Manterola C, Vial M, Schneeberger P, Peña JL, Hinostroza J, Sanhueza A. (2007). Precision of ELISA-IgE and ELISA-IgG determination in the postoperative follow-up of patients with hepatic echinococcosis. *Cirugía Española* **81**, 23-27.
- Margutti P, Ortona E, Vaccari S, Barca S, Riganò R, Teggi A, Muhschlegel F, Frosch M, Siracusano A. (1999). Cloning and expression of a cDNA encoding an elongation factor 1beta/delta protein from *Echinococcus granulosus* with immunogenic activity. *Parasite Immunology* **21**, 485-492.
- Margutti P, Ortona E, Delunardo F, Tagliani A, Profumo E, Riganò R, Buttari B, Teggi A, Siracusano A. (2008). Thioredoxin peroxidase from *Echinococcus granulosus*: a candidate to extend the antigenic panel for the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **60**, 279-285.
- Martín-Hernando MP, González LM, Ruiz-Fons F, Garate T, Gortazar C. (2008). Massive presence of *Echinococcus granulosus* (Cestoda, Taeniidae) cysts in a wild boar (*Sus scrofa*) from Spain. *Parasitology Research* **103**, 705-707.
- McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. (2003). Echinococcosis. *The Lancet* **362**, 1295-1304. Review.
- McManus DP. (2006). Molecular discrimination of taeniid cestodes. *Parasitology International* **55**, S31-37. Review.
- McVie A, Ersfeld K, Rogan MT, Craig PS. (1997). Expression and immunological characterisation of *Echinococcus granulosus* recombinant antigen B for IgG4 subclass detection in human cystic echinococcosis. *Acta Tropica* **67**, 19-35.

Morar R, Feldman C. (2003). Pulmonary echinococcosis. *The European Respiratory Journal* **21**, 1069-1077. Review.

Moro PL, Garcia HH, Gonzales AE, Bonilla JJ, Verastegui M, Gilman RH. (2005). Screening for cystic echinococcosis in an endemic region of Peru using portable ultrasonography and the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay. *Parasitology Research* **96**, 242-246.

Moro P, Schantz PM. (2009). Echinococcosis: a review. *International Journal of Infectious Diseases* **13**, 125-133. Review.

Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A. (2007). A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* **134**, 713-722.

Nasrieh MA, Abdel-Hafez SK. (2004). *Echinococcus granulosus* in Jordan: assessment of various antigenic preparations for use in the serodiagnosis of surgically confirmed cases using enzyme immuno assays and the indirect haemagglutination test. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **48**, 117-123.

Norman L, Kagan IG. (1966). Preparation and evaluation of antigens for use in the serologic diagnosis of human hydatid disease. I. Identification and partial purification of the reactive elements in *Echinococcus granulosus* antigen prepared from sheep hydatid fluid. *Journal of Immunology* **96**, 814-821.

Orduña, A.; Castrodeza, J.; Gobernado, C.; Rodríguez-Torres, A. (1985). Aplicación de un método inmunoenzimático al diagnóstico serológico de la hidatidosis humana. II. Especificidad y sensibilidad de las pruebas ELISA IgG e IgM específicas. *Revista de Laboratorio* **80**, 113-126.

Orduña A, Zarzosa P, Méndez J, Cuervo M, Bratos MA, Gutierrez P, Eiros JM, Rodríguez-Torres A. (1992). Evaluation of serology in postoperative follow-up of patients with hidatidosis without relapse. *New Trends in Mediterranean Journal of Infectious and Parasitic Diseases* **7**.

Ortona E, Riganò R, Margutti P, Notargiacomo S, Ioppolo S, Vaccari S, Barca S, Buttari B, Profumo E, Teggi A, Siracusano A. (2000). Native and recombinant antigens in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Parasite Immunology* **22**, 553-559.

Ortona E, Riganò R, Buttari B, Delunardo F, Ioppolo S, Margutti P, Profumo E, Teggi A, Vaccari S, Siracusano A. (2003). An update on immunodiagnosis of cystic echinococcosis. *Acta Tropica* **85**, 165-171. Review.

Pan D, Bera AK, Bandyopadhyay S, Das SK, Bandyopadhyay S, Bhattacharyya S, Manna B, De S, Bhattacharya D. (2010). Relative expression of antigen B coding gene of bubaline isolates of *Echinococcus granulosus* in fertile and sterile cysts. *Journal of Helminthology* **84**, 241-244.

Pan D, Bera AK, Bandyopadhyay S, Das S, Rana T, Das SK, Bandyopadhyay S, Manna B, Bhattacharya D. (2011). Molecular characterization of antigen B2 subunit in two genotypes of *Echinococcus granulosus* from Indian bubaline isolates, its stage specific expression and serological evaluation. *Molecular Biology Reports* **38**, 2067-2073.

Pardo J, Muro A, Galindo I, Cordero M, Carpio A, Siles-Lucas M. (2005). Hydatidosis in the province of Salamanca (Spain): should we let down our guard? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **23**, 266-269.

Parija SC, Ravinder PT, Rao KS. (1997). Detection of hydatid antigen in urine by countercurrent immunoelectrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 1571-1574.

- Paul M, Stefaniak J. (2001). Comparison of the dot immunobinding assay and two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the diagnosis of liver cystic echinococcosis. *Hepatology Research* **21**, 14-26.
- Pereira SV, Bertolino FA, Messina GA, Raba J. (2011). Microfluidic immunosensor with gold nanoparticle platform for the determination of immunoglobulin G anti-*Echinococcus granulosus* antibodies. *Analytical Biochemistry* **409**, 98-104.
- Piccoli L, Meroni V, Genco F, Tamarozzi F, Tinelli C, Filice C, Brunetti E. (2012). Serum cytokine profile by ELISA in patients with echinococcal cysts of the liver: a stage-specific approach to assess their biological activity. *Clinical and Developmental Immunology*, ID:483935.
- Poretti D, Felleisen E, Grimm F, Pfister M, Teuscher F, Zuercher C, Reichen J, Gottstein B. (1999). Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **60**, 193-198.
- Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. (2009). Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393**, 569-582.
- Rafiei A, Craig PS. (2002). The immunodiagnostic potential of protoscolex antigens in human cystic echinococcosis and the possible influence of parasite strain. *Annals of Tropical Medicine Parasitology* **96**, 383-389.
- Ramzy RM, Helmy H, El Zayyat EA, Rifaat MM, Abdel Hameed DM, Abdel-Baki MH. (1999). An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgG1 antibodies specific to human cystic echinococcosis in Egypt. *Tropical Medicine and International Health* **4**, 616-620.
- Ravinder PT, Parija SC, Rao KS. (1997). Evaluation of human hydatid disease before and after surgery and chemotherapy by demonstration of hydatid antigens and antibodies in serum. *Journal of Medical Microbiology* **46**, 859-864.
- Ravinder PT, Parija SC, Rao KS. (2000). Urinary hydatid antigen detection by coagglutination, a cost-effective and rapid test for diagnosis of cystic echinococcosis in a rural or field setting. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 2972-2974.
- Riganò R, Profumo E, Ioppolo S, Notargiacomo S, Ortona E, Teggi A, Siracusano A. (1995). Immunological markers indicating the effectiveness of pharmacological treatment in human hydatid disease. *Clinical and Experimental Immunology* **102**, 281-285.
- Riganò R, Profumo E, Ioppolo S, Notargiacomo S, Teggi A, Siracusano A. (1999). Serum cytokine detection in the clinical follow up of patients with cystic echinococcosis. *Clinical and Experimental Immunology* **115**, 503-507.
- Riganò R, Ioppolo S, Ortona E, Margutti P, Profumo E, Ali MD, Di Vico B, Teggi A, Siracusano A. (2002). Long-term serological evaluation of patients with cystic echinococcosis treated with benzimidazole carbamates. *Clinical and Experimental Immunology* **129**, 485-492.
- Rogan MT, Hai WY, Richardson R, Zeyhle E, Craig PS. (2006). Hydatid cysts: does every picture tell a story? *Trends in Parasitology* **22**, 431-438.
- Rojo-Vazquez FA, Pardo-Lledias J, Francos-Von Hunefeld M, Cordero-Sanchez M, Alamo-Sanz R, Hernandez-Gonzalez A, Brunetti E, Siles-Lucas M. (2011). Cystic echinococcosis in Spain: current situation and relevance for other endemic areas in Europe. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **5**, e893. Review.

- Romig T, Dinkel A, Mackenstedt U. (2006). The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitology International* **55** Suppl, S187-191. Review.
- Rosenzvit MC, Zhang LH, Kamenetzky L, Canova SG, Guarnera EA, McManus DP. (1999). Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology* **118**, 523-530.
- Rott MB, Fernández V, Farias S, Ceni J, Ferreira HB, Haag KL, Zaha A. (2000). Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. *Acta Tropica* **75**, 331-340.
- Rueda A, Sifuentes C, Gilman RH, Gutiérrez AH, Piña R, Chile N, Carrasco S, Larson S, Mayta H, Verástegui M, Rodríguez S, Gutiérrez-Correa M, García HH, Sheen P, Zimic M. (2011). TsAg5, a *Taenia solium* cysticercus protein with a marginal trypsin-like activity in the diagnosis of human neurocysticercosis. *Molecular and Biochemical Parasitology* **180**, 115-119.
- Sadjjadi SM, Sedaghat F, Hosseini SV, Sarkari B. (2009). Serum antigen and antibody detection in echinococcosis: application in serodiagnosis of human hydatidosis. *The Korean Journal of Parasitology* **47**, 153-157.
- Sambrook y Russell (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sbihi Y, Janssen D, Osuna A. (1997). Specific recognition of hydatid cyst antigens by serum IgG, IgE, and IgA using western blot. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **11**, 154-157.
- Sbihi Y, Rmiqui A, Rodríguez-Cabezas MN, Orduña A, Rodríguez-Torres A, Osuna A. (2001). Comparative sensitivity of six serological tests and diagnostic value of ELISA using purified antigen in hydatidosis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. **15**, 14-18.
- Sbihi Y, Gil JR, Alvarez PA, Orduña A, Rodríguez-Torres A, Osuna A. (2003). Development of a dipstick dye immunoassay for diagnosing hydatidosis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **17**, 219-222.
- Schantz PM. (1972). Localization of hydatidosis in the central nervous system. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* **73**, 198-202.
- Scott, J. C., Stefaniak, J., Pawlowski, Z. S. And McManus, D. P. 1997. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* **114**, 37-43.
- Shambesh MK, Craig PS, Wen H, Rogan MT, Paolillo E. (1997). IgG1 and IgG4 serum antibody responses in asymptomatic and clinically expressed cystic echinococcosis patients. *Acta Tropica* **64**, 53-63.
- Shapiro SZ, Bahr GM, Hira PR. (1992). Analysis of host components in hydatid cyst fluid and immunoblot diagnosis of human *Echinococcus granulosus* infection. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **86**, 503-509.
- Shariff M, Parija SC. (1993). Co-agglutination (Co-A) test for circulating antigen in hydatid disease. *Journal of Medical Microbiology* **38**, 391-394.
- Siles-Lucas M, Cuesta Bandera C. (1992). Caracterización de diferentes cepas de *Echinococcus granulosus* en España por SDS-PAGE. *Hidatidología* **6**, 55-59.

- Siles-Lucas M, Cuesta-Bandera C, Cesar-Benito M. (1993). Random amplified polymorphic DNA technique for speciation studies of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology Research* **79**, 343-345.
- Siles-Lucas M, Benito MC, Cuesta-Bandera C. (1996). *Echinococcus granulosus*: genomic and isoenzymatic study of Spanish strains isolated from different intermediate hosts. *Veterinary Parasitology* **63**, 273-282.
- Siles-Lucas M, Cuesta-Bandera C. (1996). *Echinococcus granulosus* in Spain: strain differentiation by SDS-PAGE of somatic and excretory/secretory proteins. *Journal of Helminthology* **70**, 253-257.
- Siles-Lucas M, Gottstein B, Felleisen RS. (1998). Identification of a differentially expressed *Echinococcus multilocularis* protein Em6 potentially related to antigen 5 of *Echinococcus granulosus*. *Parasite Immunology* **20**, 473-481.
- Siles-Lucas MM, Gottstein BB. (2001). Molecular tools for the diagnosis of cystic and alveolar echinococcosis. *Tropical Medicine International Health* **6**, 463-475. Review.
- Siles-Lucas M, Hemphill A. (2002). Cestode parasites: application of in vivo and in vitro models for studies on the host-parasite relationship. *Advances in Parasitology* **51**, 133-230. Review.
- Siracusano A, Teggi A, Ortona E. (2009). Human cystic echinococcosis: old problems and new perspectives. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, ID: 474368.
- Smego RA Jr, Sebanego P. (2005). Treatment options for hepatic cystic echinococcosis. *International Journal of Infectious Diseases* **9**, 69-76.
- Smyth JD, Howkins AB. (1966). An in vitro technique for the production of eggs of *Echinococcus granulosus* by maturation of partly developed strobila. *Parasitology* **56**, 763-766.
- Sobrino R, Gonzalez LM, Vicente J, Fernández de Luco D, Garate T, Gortázar C. *Echinococcus granulosus* (Cestoda, Taeniidae) in the Iberian wolf. (2006). *Parasitology Research* **99**, 753-756.
- Sotiraki S, Chaligiannis I. (2010). Cystic echinococcosis in Greece. Past and present. *Parasite* **17**, 205-210.
- Stojkovic M, Zwahlen M, Teggi A, Vutova K, Cretu CM, Virdone R, Nicolaidou P, Cobanoglu N, Junghanss T. (2009). Treatment response of cystic echinococcosis to benzimidazoles: a systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **3**, e524.
- Sunita T, Dubey ML, Khurana S, Malla N. (2007). Specific antibody detection in serum, urine and saliva samples for the diagnosis of cystic echinococcosis. *Acta Tropica* **101**, 187-191.
- Tamarozzi F, Meroni V, Genco F, Piccoli L, Tinelli C, Filice C, Brunetti E. (2010). Ex vivo assessment of serum cytokines in patients with cystic echinococcosis of the liver. *Parasite Immunology* **32**, 696-700.
- Tawfeek GM, Elwakil HS, El-Hoseiny L, Thabet HS, Sarhan RM, Awad NS, Anwar WA. (2011). Comparative analysis of the diagnostic performance of crude sheep hydatid cyst fluid, purified antigen B and its subunit (12 Kda), assessed by ELISA, in the diagnosis of human cystic echinococcosis. *Parasitology Research* **108**, 371-376.

Teggi A, Lastilla MG, De Rosa F. (1993). Therapy of human hydatid disease with mebendazole and albendazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 1679-1684.

Terpe K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**, 211-222. Review.

Thompson, R. C. A. (1995). Biology and systematics of *Echinococcus*. En *Echinococcus and Hydatid Disease*. R. C. A. Thompson and A. J. Lymbery, Eds. Allen & Unwin, London. pp. 1-50.

Thompson RC, McManus DP. (2002). Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends in Parasitology* **18**, 452-457. Review.

Thompson RC. (2008). The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Experimental Parasitology* **119**, 439-446. Review.

Torgerson PR, Budke CM. (2003). Echinococcosis-an international public health challenge. *Research in Veterinary Science* **74**, 191-202. Review.

Touil-Boukoffa C, Sancéau J, Tayebi B, Wietzerbin J. (1997). Relationship among circulating interferon, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6 and serologic reaction against parasitic antigen in human hydatidosis. *Journal of Interferon and Cytokine Research* **17**, 211-217.

Vacirca D, Perdicchio M, Campisi E, Delunardo F, Ortona E, Margutti P, Teggi A, Gottstein B, Siracusano A. Favourable prognostic value of antibodies anti-HSP20 in patients with cystic echinococcosis: a differential immunoproteomic approach. *Parasite Immunology* **33**, 193-198.

Valiente-Gabioud AA, Veaute C, Perrig M, Galan-Romano FS, Sferco SJ, Marcipar IS. (2011). Effect of repetitiveness on the immunogenicity and antigenicity of *Trypanosoma cruzi* FRA protein. *Experimental Parasitology* **127**, 672-679.

van Doorn HR, Hofwegen H, Koelewijn R, Gilis H, Wentink-Bonnema E, Pinelli E, van Genderen PJ, Schipper HG, van Gool T. (2007). Reliable serodiagnosis of imported cystic echinococcosis with a commercial indirect hemagglutination assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **57**, 409-412.

Verastegui M, Moro P, Guevara A, Rodriguez T, Miranda E, Gilman RH. (1992). Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for diagnosis of human hydatid disease. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 1557-1561.

Virginio VG, Hernández A, Rott MB, Monteiro KM, Zandonai AF, Nieto A, Zaha A, Ferreira HB. (2003). A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clinical and Experimental Immunology* **132**, 309-315.

Vuitton DA. (2009). Benzimidazoles for the treatment of cystic and alveolar echinococcosis: what is the consensus? *Expert Review of Anti-Infective Therapy* **7**, 145-149. Review.

Vural G, Baca AU, Gauci CG, Bagci O, Gicik Y, Lightowlers MW. (2008). Variability in the *Echinococcus granulosus* cytochrome C oxidase 1 mitochondrial gene sequence from livestock in Turkey and a re-appraisal of the G1-3 genotype cluster. *Veterinary Parasitology* **154**, 347-350.

Wen H, Craig PS. (1994). Immunoglobulin G subclass responses in human cystic and alveolar echinococcosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **51**, 741-748.

- WHO Informal Working Group on Echinococcosis. (1996). Guidelines for treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Bulletin of the World Health Organization* 74, 231-242.
- WHO Informal Working Group. (2003). International classification of ultrasound images in cystic echinococcosis for application in clinical and field epidemiological settings. *Acta Tropica* 85, 253-261.
- Zarzosa MP, Orduña Domingo A, Gutiérrez P, Alonso P, Cuervo M, Prado A, Bratos MA, García-Yuste M, Ramos G, Rodríguez Torres A. (1999). Evaluation of six serological tests in diagnosis and postoperative control of pulmonary hydatid disease patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 35, 255-262.
- Zhang W, Li J, McManus DP. (2003). Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 18-36. Review.
- Zhang W, McManus DP. (2006). Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 47, 24-41. Review.
- Zhang WB, Li J, Li Q, Yang D, Zhu B, You H, Jones MK, Duke M, McManus DP. (2007). Identification of a diagnostic antibody-binding region on the immunogenic protein EpC1 from *Echinococcus granulosus* and its application in population screening for cystic echinococcosis. *Clinical and Experimental Immunology* 149, 80-86.
- Zhang W, Li J, Jones MK, Zhang Z, Zhao L, Blair D, McManus DP. (2010). The *Echinococcus granulosus* antigen B gene family comprises at least 10 unique genes in five subclasses which are differentially expressed. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4, e784.
- Zhang WB, Xing Y, Xu XC, Abudukadeer XK, Wang YH, Wen H. (2011). Community survey, treatment and long-term follow up for human cystic echinococcosis in northwest China. *Chinese Medical Journal* 124, 3176-3179.
- Zhang W, Wen H, Li J, Lin R, McManus DP. (2012). Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: an update. *Clinical and Developmental Immunology*, ID: 101895. Review.





## **9. ANEXO I. PUBLICACIONES**

---



A continuación se exponen los trabajos publicados y manuscritos en preparación para su publicación generados a partir de la revisión del tema y de los resultados obtenidos y expuestos en esta memoria.

1. Rojo-Vazquez FA, Pardo-Lledias J, Francos-Von Hunefeld M, Cordero-Sanchez M, Alamo-Sanz R, Hernandez-Gonzalez A, Brunetti E, Siles-Lucas M. (2011).

**Cystic echinococcosis in Spain: current situation and relevance for other endemic areas in Europ.** *ej. PLoS Neglected Tropical Diseases* **5**, e893. Review.

Revisión referente a la situación actual de la hidatidosis en España y comparación con la situación en otras regiones de Europa. Información disponible en las distintas bases de datos referentes a casos humanos y animales.

2. Hernández-González A, Santivañez S, García HH, Rodríguez S, Muñoz S, Ramos G, Orduña A, Siles-Lucas M. (2012).

**Improved serodiagnosis of cystic echinococcosis using the new recombinant 2B2t antigen.** *PloS Neglected Tropical Diseases* **6**, e1714

Artículo referente a la utilidad diagnóstica del antígeno recombinante 2B2t en ELISA en comparación con el líquido hidatídico y un kit comercial de hemaglutinación indirecta. Influencia de las características clínicas del paciente en el resultado de las pruebas diagnósticas.

3. A Hernández-González, E Brunetti, F Tamarozzi, V Meroni, F Genco, T Junghanss, M Stojkovic, JM Delgado, FM Soriano, M Siles-Lucas.

**Application of the recombinant antigen 2B2t in a commercial immunochromatographic test for the diagnosis of cystic echinococcosis.**

Manuscrito en preparación.

Artículo referente a la aplicación del antígeno recombinante 2B2t a un test inmunocromatográfico. Comparación con un test comercial utilizando antígenos nativos y con el ELISA-2B2t. Influencia de las características clínicas del paciente en el resultado de dicho test.

4. A Hernández-González, E Brunetti, F Tamarozzi, V Meroni, F Genco, T Junghanss, M Stojkovic, JM Delgado, FM Soriano, M Siles-Lucas.

**Serological follow-up of human cystic echinococcosis using the recombinant antigen 2B2t.** Manuscrito en preparación.

En este trabajo se hace una definición de la utilidad del antígeno recombinante 2B2t y del B2t para las distintas modalidades de seguimiento en pacientes con hidatidosis, en comparación con el líquido hidatídico. Las tiras inmunocromatográficas con el antígeno recombinante 2B2t también son ensayadas para pacientes en seguimiento tras cirugía, siendo comparadas con el ELISA-2B2t y con otra tira comercial que contiene antígenos nativos.

## Review

# Cystic Echinococcosis in Spain: Current Situation and Relevance for Other Endemic Areas in Europe

Francisco A. Rojo-Vazquez<sup>1</sup>, Javier Pardo-Lledias<sup>2</sup>, Marcelo Francos-Von Hunefeld<sup>3</sup>, Miguel Cordero-Sanchez<sup>4</sup>, Rufino Alamo-Sanz<sup>5</sup>, Ana Hernandez-Gonzalez<sup>6</sup>, Enrico Brunetti<sup>7</sup>, Mar Siles-Lucas<sup>6\*</sup>

**1** Universidad de León, Facultad de Veterinaria, Departamento de Sanidad Animal, Campus de Vegazana, León, Spain, **2** Hospital General de Segovia, Segovia, Spain, **3** Servicio de Cirugía General y Digestiva, Hospital Nuestra Señora de Sonsoles, Avila, Spain, **4** Medicina Interna, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain, **5** Agencia de Protección de la Salud y Seguridad Alimentaria, Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain, **6** Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Salamanca, Spain, **7** Division of Infectious and Tropical Diseases, University of Pavia, IRCCS S. Matteo Hospital Foundation, WHO Collaborating Centre for Clinical Management of Cystic Echinococcosis, Pavia, Italy

**Abstract:** Cystic echinococcosis (CE) remains an important health problem in many regions of the world, both where no control measures have been implemented, and where control programs have been incompletely successful with ensuing re-emergence of the disease. In Spain, official data on CE show an increase in the proportion of intermediate hosts with CE during the last few years, and autochthonous pediatric patients have been reported, a sign of active local transmission of disease. A similar picture emerges from data reported to the European Food Safety Authority by other European countries. Nevertheless, several crucial aspects related to CE that would help better understand and control the disease have not been tackled appropriately, in particular the emergence of infection in specific geographical areas. In this respect, while some data are missing, other data are conflicting because they come from different databases. We review the current situation of CE in Spain compared with areas in which similar problems in the CE field exist, and offer recommendations on how to overcome those limitations. Specifically, we believe that the introduction of national registries for CE with online data entry, following the example set by the European Registry for Alveolar Echinococcosis, would help streamline data collection on CE by eliminating the need for evaluating and integrating data from multiple regions, by avoiding duplication of data from patients who access several different health facilities over time, and by providing much needed clinical and epidemiological data that are currently accessible only to clinicians.

## Introduction

*Echinococcus granulosus* is a cestode whose larval stage causes cystic echinococcosis (CE) in livestock, wild animals, and humans. CE is acquired by ingesting eggs, originating from the faeces of definitive hosts (dogs, wolves, and other carnivores), that harbour the adult *E. granulosus* worms in their small intestine (Figure 1). CE is a neglected disease and the cause of significant losses in endemic areas [1,2].

Where the importance of CE has been recognized, control programs have been implemented, leading to a drastic reduction in its prevalence. This has also caused the discontinuation of control measures and the exclusion of CE from the list of notifiable diseases.

Several publications have documented the re-emergence of CE in different European areas, e.g., Wales [3] and Spain [4], where

high incidence rates of echinococcosis in dogs and new CE autochthonous cases in young people have been recently reported. As a result, CE has a renewed importance in Europe [5]. This has also been recognized by the European authorities through directive 2003/99/EC, in which CE is a disease to be reported to the European Food Safety Authority (EFSA).

This re-emergence should raise our awareness of crucial and incompletely elucidated aspects of this disease. Here, we present the latest data about CE in Spain and the suggestions from an expert panel about issues that have not been addressed, with a look at other countries that share the problem.

## Methods

We ran a Medline search using “cystic echinococcosis” and “hydatid” combined with “epidemiology”, “diagnosis”, and “control programs” as keywords. Additional articles were obtained from non-SCI journals published in Spain, Portugal, Italy, etc. Individual articles and other pieces of information were not excluded with regard to potential biases, since one of the goals was also to discuss said biases.

Statistics on CE in Spain and Europe were retrieved from the Ministerio de Sanidad y Consumo (<http://www.msps.es>), the Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Spain (<http://www.mapa.es>), and the EFSA (<http://www.efsa.europa.eu>). The review also drew on conference proceedings, original research conducted by the authors, and discussions in specific forums (e.g., the Conferences of the Spanish Hidatidology Association held in 2008 and 2010 at Salamanca, Spain).

**Citation:** Rojo-Vazquez FA, Pardo-Lledias J, Francos-Von Hunefeld M, Cordero-Sanchez M, Alamo-Sanz R, et al. (2011) Cystic Echinococcosis in Spain: Current Situation and Relevance for Other Endemic Areas in Europe. *PLoS Negl Trop Dis* 5(1): e893. doi:10.1371/journal.pntd.0000893

**Editor:** Simon Brooker, London School of Hygiene & Tropical Medicine, United Kingdom

**Published:** January 25, 2011

**Copyright:** © 2011 Rojo-Vazquez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The meeting of authors and subsequent discussion has been financed by the Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León. MSL acknowledges financial support for her CE research from the Junta de Castilla y León. AHG acknowledges the financing from the JAE-CSIC PhD grant program. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: mmar.siles@irnasa.csic.es

## Key Learning Points

- Cystic echinococcosis (CE) remains one of the main zoonoses in both developing and developed countries, due to its complex clinical presentation, and causes a substantial number of cases in some areas.
- Recent analyses have shown that CE is a re-emerging disease with a remarkable economic impact in developed countries such as Spain.
- In spite of numerous studies, evidence-based and standardized/agreed approaches are still needed to define appropriate strategies for the epidemiological evaluation, immunodiagnosis, and clinical management of CE, among other aspects.
- The need for a continuous, homogeneous, and well-defined source of epidemiological data on human CE, improving the current EFSA reports, and modeling national registries after the European Registry for Alveolar Echinococcosis, is emphasized.

## Five Key Papers in the Field

1. Brunetti E, Kern P, Vuitton DA; Writing Panel for the WHO-IWGE (2010) Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop* 114: 1–16.
2. Brunetti E, Junghans T (2009) Update on cystic hydatid disease. *Curr Opin Infect Dis* 22: 497–502.
3. Budke CM, Deplazes P, Torgerson PR (2006) Global socio-economic impact of cystic echinococcosis. *Emerg Infect Dis* 12: 296–303.
4. Kern P, Bardonnnet K, Renner E, Auer H, Pawlowski Z, et al. (2003) European echinococcosis registry: human alveolar echinococcosis, Europe, 1982–2000. *European Echinococcosis Registry. Emerg Infect Dis* 9:343–349.
5. Craig PS, Budke CM, Schantz PM, Li T, Qiu JJ, et al. (2007) Human echinococcosis: a neglected disease? *Trop Med Health* 35: 283–292.

## Recommendations

1. Notification of human CE and echinococcosis surveillance should be compulsory at the national level in European countries.
2. More detailed and uniform surveillance and confirmation criteria of cases for CE and echinococcosis in animals and human patients should be established in Europe.
3. Tools for the detection of CE applicable to epidemiological, diagnostic, and follow-up purposes should be standardized and widely agreed upon.
4. Genotyping of *Echinococcus granulosus* isolates from human patients and from wild hosts should be carried out for a proper assessment of the current epidemiological situation in Europe.



**Figure 1. Epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Spain.** The main domestic cycle is maintained between dogs and sheep, with man as accidental intermediate host (a; white arrows). Wild cycles could occur between wolves, wild boars, and cervids, among others (b). The sylvatic cycle could be occasionally peridomestic (black arrow), since the G1 genotype, the most frequent in sheep and human patients, has been found in isolates from wild animals.  
doi:10.1371/journal.pntd.0000893.g001

## Cystic Echinococcosis in Animals: Epidemiological Changes

The lack of reliable statistics on the epidemiology of echinococcosis in dogs makes it difficult to compare prevalence rates before and after the application of control programs in Spain. A similar picture is found in other European countries, in which data about dog infection rates are scarce and difficult to interpret. Monitoring and notification of echinococcosis in dogs is not compulsory in Europe, and this information is not available to the EFSA.

The most complete data published to date about Spain are those from the CE control campaign in the northern Spanish region of La Rioja [6]. This campaign started in 1986, and CE prevalence in the definitive host, measured by necropsy of stray and unwanted dogs, was 7% at the beginning of the program, and 0.2% in 2000. A later study performed on shepherd dogs using *E. granulosus* coproantigen detection in the region of Alava, close to La Rioja, showed 8% of dogs to be positive [7]. Coproantigen ELISA tests to detect echinococcosis in definitive hosts are well established and documented [8], meaning that an active transmission of the parasite actually occurs in defined environments nowadays.

A similar situation following the discontinuation of respective control programs can be found in other European regions, such as Wales, where prevalence in rural dogs increased from 3.4% in 1989 to 8.1% in 2002 [3]. Although the information that can be

gleaned from the above-mentioned studies is scarce, their findings suggest that rural and semi-rural dog populations are still at risk of infection with *E. granulosus* in these and in other regions of Europe where similar control campaigns had taken place.

A second point of concern is the role of wild definitive hosts in the epidemiology of *E. granulosus*. Infection with *E. granulosus* has been recently reported in the Iberian wolf [9,10]. Although sample sizes are small, these authors claim that prevalence of echinococcosis in wolves, whose number increased in Europe in recent years due to protection policies (<http://ec.europa.eu/environment/nature/conservation>), might be higher than 14% in some regions of Spain [10]. More importantly, all positive wolves harbored gravid worms from the G1 strain [10], the cause of most human infections (reviewed in [11]). Wolves parasitized with *E. granulosus* have also been found in Belarus, Italy, Finland, and Bulgaria [12–15], with prevalence rates from 11.5% to 36%. Wild definitive hosts may contribute to the spread of human and animal CE in domestic cycles (Figure 1), and their role deserves further study in specific areas. Additional factors, such as the economic, social, and cultural conditions, sheep rising in extensive or semi-extensive (non-confined) systems, and transhumance may all facilitate the cross-talk of wild cycles with domestic environments.

Moreover, the prevalence of CE in domestic animals reported in recent studies on control campaigns differs from official data in some countries. In Spain, a CE prevalence of 0.98% for ovine and goats is officially recorded in 2000, while data recovered by personnel working in CE control programs showed 20 times that prevalence for sheep in specific Spanish regions, such as La Rioja, for the same year [6]. Official data show that from 2000 to 2008 (Table 1), bovine CE has decreased from 0.97% in 2000 to around 0.5% in 2008. Swine CE has been slowly decreasing from 2000 to 2008, although this data refers to intensively raised animals only. When data from extensively raised animals are available, prevalence rates are much higher compared to those in intensive (confined) farming animals. For example, in 2007 0.81% of extensively raised pigs had CE, compared with 0.02% of pigs maintained under intensive raising (Table 1). The higher prevalence found in extensive farm systems compared with intensively raised animals in pigs could also extend to other extensively raised CE hosts, e.g., sheep, which hosts the G1 human-infective strain. Sheep and goat CE remained below 2% from 2000 to 2007, but data from 2008 show that 3.68% of slaughtered animals were infected. Potential biases affecting data from 2008 and not affecting previous reports, e.g., the total number of inspected animals, are excluded, since the EFSA

reports from 2007 and 2008 show that the number of inspected sheep and goats in Spain was higher in 2007 than in 2008. Similarly, other sources of error that might affect CE rates, such as the average animal's age, are excluded since no specific campaign for the slaughtering of old animals—with a higher likelihood of presenting visible cysts—had been carried out in Spain in that period. CE levels above 2% in sheep have also been reported to the EFSA in 2008 (<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/1496.htm>) in Bulgaria (4.3%), Italy (11.3%), Poland (6.7%), and Romania (5%). High levels of sheep CE were also reported in Portugal and Greece in 2007 (9.4% and 3.9%, respectively; <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/223r.htm>).

The potential role of wild intermediate hosts in the maintenance and spreading of CE into domestic environments is of interest to Spain. Data provided to the EFSA from Spain represent a proportion of randomly inspected hunted animals for human consumption. However, the detection of fertile cysts in wild boar suggest that this species may be involved in the epidemiology of *E. granulosus*, particularly considering that large amounts of carcass are available to dogs and wolves during the hunting season. The recent population increase of wild boar in Spain, and the DNA analysis showing that they harbor the G1 strain, indicates the importance of this wild host for public health in Spain [16] and in other European countries [17]. Estimated prevalence rates of CE in wild boars have only been reported in the last four national reports in Spain (from 2005 to 2008), showing an increase from 0.04% to 0.17% (Table 1). Cervid CE in Spain has been evaluated only from 2006, showing a low prevalence with a small increase in the last reported year (Table 1). Although the role of cervids in domestic-transmitted CE is probably minor due to the possible restriction to European cervids of the *E. granulosus* G10 genotype (reviewed in [18]), more detailed genotyping studies should be conducted to rule out G10 human infection or cervid infections with *E. granulosus* genotypes other than G10.

G7 may also play a role in human infections. It has been found in pigs, goats, and humans in Austria, Yugoslavia, Romania, Poland, Spain, and Turkey [19–21]. The importance of this and other genotypes in the epidemiology of CE is not well known, so molecular typing of human isolates of *E. granulosus* deserves to be systematically carried out in several areas of Europe.

## Current Situation of Human CE in Spain

In Spain, human CE has been a notifiable disease from 1982 to 1996. The Spanish official statistics showed a human CE incidence of 2.52 cases per 100,000 inhabitants in 1982. Control programs were started between 1986 and 1990 in different regions of the country, and were mainly based on the periodic treatment of dogs with praziquantel. This, and the strict control of carcasses after the occurrence of animal diseases such as spongiform encephalopathy in cattle and blue tongue in sheep, resulted in the decrease of human CE incidence to 1.01/100,000 inhabitants in 1996 (reviewed in [22]). From 1996 onwards, human CE cases registered at the national level have been those spontaneously declared by the different regions to the state authorities, and this may represent a problem, as stated by other authors from different European countries [5,23]. In Spain, a comparison of notified cases with data from hospital records has shown that human CE case numbers have been clearly underestimated in the last 10 years (e.g., [4]). Thus, and for specific regions of Spain e.g., Castilla-León, the declared CE cases were 2.69/100,000, while those calculated from hospital records was four times higher for the same period [4]. Similarly, the latest surgical CE rates in Greece, Portugal, and Italy [23–26] were 12/100,000, 12.2/100,000, and

**Table 1.** Prevalence (%) of cystic echinococcosis in livestock and wild animals in Spain from 2000 to 2008.

Animals	Year									
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	
Bovine	0.97	0.79	0.70	0.59	0.59	0.70	0.75	0.50	0.52	
Swine (intensive)	0.20	0.04	0.03	0.03	0.07	0.03	0.05	0.02	0.03	
Swine (extensive)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.49	0.81	0.37	
Sheep and goats	0.98	1.18	1.01	0.67	0.46	0.57	0.45	0.57	3.68	
Wild boar	NA	NA	NA	NA	NA	0.04	0.06	0.13	0.17	
Cervids	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.01	0.01	0.05	

Source: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Spain. NA, not available.

doi:10.1371/journal.pntd.0000893.t001

**Table 2.** Reported cases per 100,000 inhabitants of cystic echinococcosis in Spain from 2000 to 2008.

Source	Year									
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	
EDOs	0.45	0.45	0.48	0.43	0.39	0.37	0.54	0.40	0.40	
EFSA	NA	NA	NA	NA	<0.01	0.20	0.20	0.30	0.20	
SIM	0.10	0.02	0.08	0.06	0.02	<0.01	0.00	0.06	0.03	
CMBS	2.04	1.75	1.75	1.74	1.80	1.39	NA	NA	NA	
Castilla-León	1.62	1.70	2.84	2.11	2.00	1.88	2.97	1.90	NA	

Source: Ministerio de Sanidad, Spain, from the databases "Enfermedades de Declaración Obligatoria" (EDOs), "Sistema Microbiológico de Información" (SIM), and "Conjunto Mínimo Básico de Datos" (CMBS); European Food Security Authority (EFSA); and Consejería de Sanidad y Bienestar Social de la Junta de Castilla y León (Castilla-León). NA, not available.  
doi:10.1371/journal.pntd.0000893.t002

up to 9.8/100,000 inhabitants per year, respectively, while notification of human CE to the EFSA from 2004 to 2008 from the same countries has been approximately ten times lower.

In addition, an increase of autochthonous cases of human CE was officially reported in 2006, with 0.54 cases per 100,000 inhabitants at the national level in Spain, this being the highest rate in the last 7 years (Table 2). More importantly, several pediatric cases were detected over that time period, indicating an active transmission of the parasite [27] (Figure 2). Re-emergence of human CE is also found in several countries where specific control programs have been applied in the past (reviewed in [1,28]). This means that risk factors associated with human infection in different areas should be specifically assessed. In Spain, these risk factors were enumerated before the cessation of respective control campaigns by Campos-Bueno et al. [29]. Due to potential changes in the epidemiology of the parasite transmission, they should be re-evaluated in patients acquiring the infection in the last ten to 15 years in defined areas, as suggested by a study recently done in Germany [5]. Unfortunately, this re-evaluation cannot be performed with the currently

available information from EFSA, since that does not include traceability of human cases related with crucial aspects such as occupational and other risks (e.g., hunting). The autochthonous character of human cases, an important factor for decisions on control measures, should in theory be assessed with the EFSA data, but their reliability is weakened by the fact that some countries, including Spain, have reported all cases from 2004 to 2008 as domestic. This is difficult to believe, since a sizeable proportion (30%–60%, depending on the hospital) of CE cases from Spanish hospital records correspond to immigrants from endemic countries (M. Siles-Lucas, J. Pardo-Lledias, and A. Hernandez-Gonzalez, unpublished data), as expected of a country where immigrants are more than 10% of the general population.

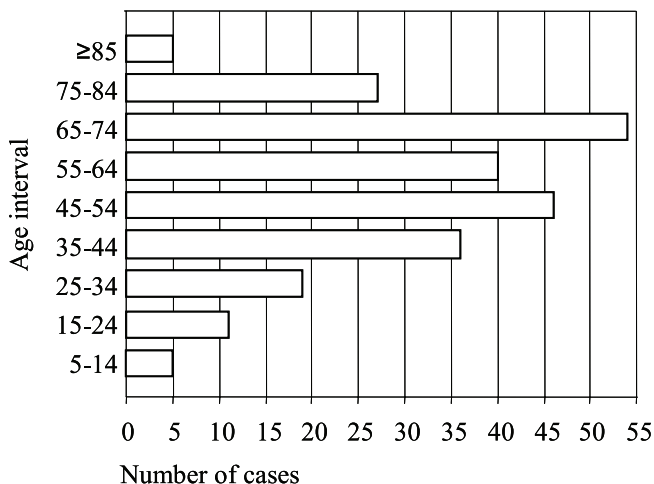
A comparison of CE human cases presented in three different Spanish databases, together with the cases notified to the EFSA and those notified by authorities in a specific Spanish region (Castilla-León) for the period 2000–2008, is shown in Table 2.

### Problems Peculiar to CE and Limitations of the EFSA Reports: Relevance for the European Endemic Zone

Short-term, periodic de-worming of dogs was one of the key points of control programs in Spain, but as it has been discontinued, deparasitization of dogs is now done once or twice a year, thus not covering the much shorter prepatent period of *E. granulosus* adult worms if present. This may result in the survival of the parasite in specific dog populations that actively shed the parasite. This seems to be the case in Spain, since animal CE has re-emerged and human CE also involves pediatric patients, and may well apply to other European countries with similar epidemiological scenarios.

Although the infection in dogs is probably the first indication of an active transmission of the parasite, data about infection rates in this and other *E. granulosus* definitive hosts are not notifiable to the EFSA. Interestingly, however, some data about fox infection with *Echinococcus multilocularis* are detailed in the EFSA annual report.

Data about dog prevalences are only found in a few publications, and are frequently biased since there is no consensus



**Figure 2.** Age distribution of cystic echinococcosis human cases reported in Spain in 2006. Source: National Statistics Institute. Five autochthonous CE cases are found in the age range 5–14 years, indicating active transmission of the parasite. The rest of the cases are distributed as follows: 11 cases among 15- to 24-year-old patients, 19 among those aged 25–34, 36 among those aged 35–44, 46 among those aged 45–54, 40 among those aged 55–64, 54 among those aged 65–74, 27 among those aged 75–84, and five among patients aged 85 years old or more.  
doi:10.1371/journal.pntd.0000893.g002



on what should be measured (e.g., dog subpopulation, seasonality, age structure, number of samples, etc.) or on the diagnostic method to use. In most studies, these variables are not or are only partly considered; thus, interpretation of tendencies or of specific time-point data is impossible. In any case, the results of studies on prevalence in dogs from several European countries are worrisome. Those done in Spain, and more specifically in Alava on shepherd dogs using coproantigen detection [7], and data from Wales [3] and some Italian regions (reviewed in [30]), show dogs to be infected at a rate of about 10%.

Data from farm animal CE prevalence in Spain reported to the EFSA are obtained on all slaughtered animals by inspection each year. Even so, these are probably underestimations, as the vast majority of slaughtered animals—especially sheep—are less than 1 year old, less than the time needed for the oncosphere to develop into a visible lesion; only 4% of slaughtered sheep in 2008 in Spain were older than 12 months (<http://www.mapa.es/es/ganaderia>). An example of this underestimation can be found in the official data from the Spanish Castilla-León region, where reports on sheep CE was 3.87% for animals under 12 months of age, and 38.47% for sheep older than 5 years ([http://www.salud.jcyl.es/sanidad/cm?locale=es\\_ES&textOnly=false](http://www.salud.jcyl.es/sanidad/cm?locale=es_ES&textOnly=false)). Here, the problem is related to the animal's age at the time of sacrifice, although data are probably showing the true tendency of CE in Spain, since all slaughtered animals are reported. Nevertheless, underestimations have consequences on policy making, resulting in the minimization of the true importance of the problem and in playing down the need of new and better documented studies.

In other European countries, CE data on farm animals reported to EFSA are limited to small numbers far inferior to the total of slaughtered animals in the same period. For example, Italy reports data of CE in sheep for 358,602 animals in 2008, while FAOSTAT data shows that in 2008 6,189,767 sheep were slaughtered in Italy (<http://faostat.fao.org/site/603/default.aspx#anchor>). It is impossible to know whether the reported animals were randomly selected from several areas or are from a specific area inside the country in which CE incidence is high, medium, or low, and this makes discerning trends, if any, impossible.

Important additional information to assess CE epidemiology such as age, geographical origin, or raising practices for animals is not collected. In our opinion, these data would be easily obtained in countries where an animal tracking system has been imposed by the authorities, like in Spain (<http://www.mapa.es/es/ganaderia/pags/regal/riiaremo.htm>).

Data from CE in wild animals are reported to EFSA by some European countries, representing, in the case of Spain, only a proportion of randomly inspected hunted animals. We are not aware of the mandatory character of inspections or of the proportion of animals inspected in other European countries. Unfortunately, the extent and significance of infection of wildlife for humans cannot be assessed with the currently available data. A clear protocol on how to collect information about CE rates in wild animals, as well as typing of *E. granulosus* isolates, should be outlined.

Regarding human CE data, Spain has three different databases: the “Enfermedades de Declaración Obligatoria” or EDOs (declarable diseases), the “Sistema de Información Microbiológica” (SIM, system of microbiological information), and the “Conjunto Mínimo Básico de Datos” (CMBD, minimum database). All are maintained by the Spanish Ministry of Health, but each database gives a different number of human CE cases for the same year (Table 2). The CMBD database shows the highest CE rates, although it only reports CE patients who underwent surgery. Nevertheless, a variable amount of cysts remain clinically silent or are not surgically removed [31].

Furthermore, the EDOs data should be transferred to the EFSA, but Spanish data of human CE in the EFSA reports also differ from EDOs, SIM, and CMBD (Table 2). Differences between EDOs and EFSA-declared data might be due to the method used for case confirmation, which should be histopathology. Thus, EFSA figures may represent only a fraction of EDOs. Nevertheless, discrepancies between both databases are also related with relative proportion of patients along time, since they do not indicate the same trend over time.

Notification systems in other European countries may suffer from the same problems. Additionally, in some European countries such as Italy, the notification for human CE has also ceased to be mandatory. The ensuing underreporting leads authorities to think that CE is not an important health problem, which in turn makes measurement of disease burden even more difficult.

Human CE data in the EFSA reports are sometimes accompanied by tables with age distribution of cases, showing the occurrence of pediatric cases, but these are not assigned to a specific country. Even if they were, a second problem would remain, the autochthonous character of human cases, which has epidemiological and policy making implications. Autochthonous cases are reported for some countries in the EFSA bulletin, but as mentioned above, Spain has declared all cases from 2004 to 2008 as domestic. These data are hardly credible for the reasons mentioned above (M. Siles-Lucas, J. Pardo-Lledias, and A. Hernandez-Gonzalez, unpublished).

To make matters worse, CE has many clinical peculiarities with epidemiological implications. The understanding of the natural history of liver cysts has greatly improved with the use of ultrasound and of a standardized classification [32–34], but these important details are not collected in the notification form. Further, given the chronic nature of their illness and the frequent relapses, patients with CE often move from one treatment center to another, which also contributes to unreliable statistics. In any case, traceability of human cases, as well as other aspects important for the re-evaluation of the epidemiological situation of CE in Europe, such as occupation and previous or current residence in an endemic area, should be obtained.

## Conclusions

Available information on CE is incomplete and is insufficient to assess properly its epidemiology in Spain and other European countries. CE importance tends to be underestimated due to underreporting and to the lack of compulsory notification. In spite of this, Benner et al. [35] attempted to calculate the overall economic losses due to human and animal CE in Spain in 2005. Assuming no underreporting, they estimated an annual loss of €148,964,534. This shows the need for increased monitoring and control of CE in those countries where CE continues to affect certain areas despite several control initiatives. We believe that these limitations could be overcome, at a relatively low cost, with the establishment of national registries for CE with Internet electronic data entry, following the example set by the European Registry for Alveolar Echinococcosis [36]. The registry would help streamline data collection on CE by eliminating the need for evaluating and integrating separate data from multiple regions, by avoiding duplication of data from patients who access several different health facilities over time, and by providing much needed clinical and epidemiological data that are currently accessible only to single clinicians. The registry could be used as a tool to prioritize control measures for what is essentially a preventable disease. Unsurprisingly, these suggestions are similar to those

offered by the Scientific Panel on Animal Health and Welfare in Europe to the EFSA regarding *E. multilocularis* [37]. Indeed, the problems outlined in this review regard not only CE, but other neglected zoonotic diseases as well, such as cysticercosis.

CE warrants more attention from clinicians, but their coordination with veterinarians and policy makers is also required to implement a more effective approach to CE control.

## References

- Budke CM, Deplazes P, Torgerson PR (2006) Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerg Infect Dis* 12: 296–303.
- Craig PS, Budke CM, Schantz PM, Li T, Qiu JJ, et al. (2007) Human Echinococcosis: A Neglected Disease? *Trop Med Health* 35: 283–292.
- Buishi I, Walters T, Guildea Z, Craig P, Palmer S (2001) Reemergence of canine *Echinococcus granulosus* infection, Wales. *Emerg Infect Dis* 11: 568–571.
- Pardo J, Muro A, Galindo I, Cordero M, Carpio A, et al. (2005) Hydatidosis in the province of Salamanca (Spain): should we let down our guard? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 23: 266–269.
- Richter J, Orhun A, Grüner B, Müller-Stöver I, Reuter S, et al. (2009) Autochthonous cystic echinococcosis in patients who grew up in Germany. *Euro Surveill* 14: 1–7.
- Jiménez S, Pérez A, Gil H, Schantz P, Ramalle E, et al. (2002) Progress in control of cystic echinococcosis in La Rioja, Spain: decline in infection prevalences in human and animal hosts and economic costs and benefits. *Acta Trop* 83: 213–221.
- Benito A, Carmena D, Joseph L, Martínez J, Guisantes JA (2006) Dog echinococcosis in northern Spain: comparison of coproantigen and serum antibody assays with coprological exam. *Vet Parasitol* 142: 102–111.
- Craig PS, Gasser RB, Parada L, Cabrera P, Parietti S, et al. (1995) Diagnosis of canine echinococcosis: comparison of coproantigen and serum antibody tests with arecoline purgation in Uruguay. *Vet Parasitol* 56: 293–301.
- Segovia J, Torres J, Miquel J, Llaneza L, Feliu C (2001) Helminths in the wolf, *Canis lupus*, from north-western Spain. *J Helminthol* 75: 183–192.
- Sobrinho R, Gonzalez LM, Vicente J, Fernández de Luco D, Garate T, et al. (2006) *Echinococcus granulosus* (Cestoda, Taeniidae) in the Iberian wolf. *Parasitol Res* 99: 753–756.
- McManus DP, Thompson RC (2003) Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology* 127: S37–S51.
- Shimalov VV, Shimalov VT (2000) Helminth fauna of the wolf (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) in Belorussian Polesie. *Parasitol Res* 86: 163–164.
- Guberti V, Bolognini M, Lanfranchi P, Battelli G (2004) *Echinococcus granulosus* in the wolf in Italy. *Parassitologia* 46: 425–427.
- Hirvelä-Koski V, Haukisalmi V, Kilpelä SS, Nylund M, Koski P (2003) *Echinococcus granulosus* in Finland. *Vet Parasitol* 111: 175–192.
- Breyer I, Georgieva D, Kurdova R, Gottstein B (2004) *Echinococcus granulosus* strain typing in Bulgaria: the G1 genotype is predominant in intermediate and definitive wild hosts. *Parasitol Res* 93: 127–130.
- Martín-Hernando MP, González LM, Ruiz-Fons F, Garate T, Gortazar C (2008) Massive presence of *Echinococcus granulosus* (Cestoda, Taeniidae) cysts in a wild boar (*Sus scrofa*) from Spain. *Parasitol Res* 103: 705–707.
- Busi M, Snábel V, Varcasia A, Garippa G, Perrone V, et al. (2007) Genetic variation within and between G1 and G3 genotypes of *Echinococcus granulosus* in Italy revealed by multilocus DNA sequencing. *Vet Parasitol* 150: 75–83.
- Romig T, Dinkel A, Mackenstedt U (2006) The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol Int* 55: S187–S191.
- González LM, Daniel-Mwambete K, Montero E, Rosenzvit MC, McManus DP, et al. (2002) Further molecular discrimination of Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Exp Parasitol* 102: 46–56.
- Snábel V, Altintas N, D'Amelio S, Nakao M, Romig T, et al. (2009) Cystic echinococcosis in Turkey: genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. *Parasitol Res* 105: 145–154.
- Schneider R, Gollackner B, Schindl M, Tucek G, Auer H (2010) *Echinococcus canadensis* G7 (pig strain): an underestimated cause of cystic echinococcosis in Austria. *Am J Trop Med Hyg* 82: 871–874.
- Carmena D, Sánchez-Serrano LP, Barbero-Martínez I (2008) *Echinococcus granulosus* infection in Spain. *Zoonoses Public Health* 55: 156–165.
- Montinaro L, Sisinni AG, Sartorelli P (2004) L'echinococcosi: un'endemia persistente. *G Ital Med Lav Erg* 26: 202–207.
- Sotiraki S, Himonas C, Korkoliakou P (2003) Hydatidosis-echinococcosis in Greece. *Acta Trop* 85: 197–201.
- David Morais JA (2007) Human hydatidosis in the District of Evora, Portugal. A clinical-epidemiological study over a quarter of a century. *Acta Med Port* 20: 1–10.
- Gabriele F, Bortoletti G, Conchedda M, Palmas C, Ecça AR (2004) Human cystic hydatidosis in Italy: a public health emergency? Past to present. *Parassitologia* 46: 39–43.
- Ministerio de Sanidad y Consumo, España (2006) Enfermedades transmisibles declaradas en España (notificación individualizada). Available: <http://www.isciii.es/hdocs/centros/epidemiologia/pdf/InformeannualEDO2006.pdf>. Accessed 2009 Sep 7.
- Moro P, Schantz PM (2009) Echinococcosis: a review. *Int J Infect Dis* 13: 125–133.
- Campos-Bueno A, López-Abente G, Andrés-Cercadillo AM (2000) Risk factors for *Echinococcus granulosus* infection: a case-control study. *Am J Trop Med Hyg* 62: 329–334.
- Garippa G, Varcasia A, Scala A (2004) Cystic echinococcosis in Italy from the 1950s to present. *Parassitologia* 46: 387–391.
- Junghans T, da Silva AM, Horton J, Chiodini PL, Brunetti E (2008) Clinical management of cystic echinococcosis: state of the art, problems, and perspectives. *Am J Trop Med Hyg* 79: 301–311.
- WHO Informal Working Group on Echinococcosis (2003) International classification of ultrasound images in cystic echinococcosis for application in clinical and field epidemiological settings. *Acta Trop* 85: 253–261.
- Brunetti E, Junghans T (2009) Update on cystic hydatid disease. *Curr Opin Infect Dis* 22: 497–502.
- Brunetti E, Kern P, Vuitton DA, Writing Panel for the WHO-IWGE (2010) Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop* 114: 1–16.
- Benner C, Carabin H, Sánchez-Serrano LP, Budke CM, Carmena D (2010) Analysis of the economic impact of cystic echinococcosis in Spain. *Bull World Health Organ* 88: 49–57.
- Kern P, Bardonnnet K, Renner E, Auer H, Pawlowski Z, et al. (2003) European echinococcosis registry: human alveolar echinococcosis, Europe, 1982–2000. *European Echinococcosis Registry. Emerg Infect Dis* 9: 343–349.
- EFSA (2006) Assessment of the risk of echinococcosis introduction into the UK, Ireland, Sweden, Malta and Finland as a consequence of abandoning national rules. *The EFSA Journal* 441: 1–54.

# Improved Serodiagnosis of Cystic Echinococcosis Using the New Recombinant 2B2t Antigen

Ana Hernández-González<sup>1</sup>, Saúl Santivañez<sup>2</sup>, Héctor H. García<sup>2</sup>, Silvia Rodríguez<sup>2</sup>, Santiago Muñoz<sup>3</sup>, Guillermo Ramos<sup>4</sup>, Antonio Orduña<sup>4</sup>, Mar Siles-Lucas<sup>1\*</sup>

**1** IRNASA, CSIC, Salamanca, Spain, **2** Instituto Peruano de Parasitología Clínica y Experimental (INPPACE), Lima, Perú, **3** Hospital Clínico de Salamanca, Salamanca, Spain, **4** Hospital Universitario de Valladolid, Valladolid, Spain

## Abstract

A standardized test for the serodiagnosis of human cystic echinococcosis (CE) is still needed, because of the low specificity and sensitivity of the currently available commercial tools and the lack of proper evaluation of the existing recombinant antigens. In a previous work, we defined the new ELISA-B2t diagnostic tool for the detection of specific IgGs in CE patients, which showed high sensitivity and specificity, and was useful in monitoring the clinical evolution of surgically treated CE patients. Nevertheless, this recombinant antigen gave rise to false-negative results in a percentage of CE patients. Therefore, in an attempt to improve its sensitivity, we constructed B2t-derived recombinant antigens with two, four and eight tandem repeat of B2t units, and tested them by ELISA on serum samples of CE patients and patients with related parasites. The best diagnostic values were obtained with the two tandem repeat 2B2t antigen. The influence of several clinical variables on the performance of the tests was also evaluated. Finally, the diagnostic performance of the 2B2t-ELISA was compared with that of an indirect haemagglutination commercial test. The 2B2t recombinant antigen performed better than the HF and B2t antigens, and the IHA commercial kit. Therefore, this new 2B2t-ELISA is a promising candidate test for the serodiagnosis of CE in clinical settings.

**Citation:** Hernández-González A, Santivañez S, García HH, Rodríguez S, Muñoz S, et al. (2012) Improved Serodiagnosis of Cystic Echinococcosis Using the New Recombinant 2B2t Antigen. *PLoS Negl Trop Dis* 6(7): e1714. doi:10.1371/journal.pntd.0001714

**Editor:** Wenbao Zhang, Queensland Institute of Medical Research, Australia

**Received:** January 12, 2012; **Accepted:** May 16, 2012; **Published:** July 3, 2012

**Copyright:** © 2012 Hernández-González et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the Junta de Castilla y Leon, Spain (projects CSI269A11-2 and CSI08A08). AHG is a holder of a JAE predoctoral contract (CSIC, Spain). SS and SR acknowledge financial support of the National Institutes of Health-Fogarty International Center (training grant TW001140). HHG is now a Wellcome Trust Senior International Fellow in Public Health and Tropical Medicine. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have read the competing interests policy and have the following competing interests to declare: Authors Siles-Lucas and Hernandez-Gonzalez are holders of the patent on the 2B2t antigen.

\* E-mail: mmar.siles@irnasas.csic.es

## Introduction

Cystic echinococcosis (CE) is a zoonosis caused by the metacestode of *Echinococcus granulosus*. In Europe, this cestode is more commonly found in Mediterranean countries, where it is usually maintained through a domestic life cycle involving dogs and sheep [1–2]. CE is still a cause for concern in many European countries [3]. It is also a major problem in developing countries, where it carries significant morbidity and mortality in both humans and animals [4–5].

CE diagnosis is mostly based on imaging techniques and can be facilitated by using the WHO international classification of ultrasound images in CE [6]. This classification is also useful in determining the type of cyst according to its activity (i.e., active: CE1, CE2; transitional: CE3a, CE3b; or inactive: CE4, CE5), and to monitor the clinical evolution of patients. Most importantly, the classification was recently validated by a study that used Magnetic Resonance Spectroscopy to investigate the metabolic profiles of the different cyst stages [7]. Laboratory and imaging data are usually sufficient to establish a reliable diagnosis but sometimes they are inconclusive [8]. An immunoassay can be used as a confirmatory test, and usually consists of an *E. granulosus* hydatid fluid (HF) antigen ELISA [8]. The sensitivity of the HF-ELISA for the diagnosis of different cases of CE ranges between 50 and 98%,

and depends on the localization, size, number and stage of cysts. Several other factors, such as the time between initiation of treatment onset and the date of serum collection, CE antecedents (patients suffering of a previous CE), and the presence of complications, could also affect the results of the tests. This may explain the great variability in the sensitivity reported by different laboratories using the same antigen (HF or recombinant antigens) [9]. However, in most articles published in the field, data on these variables were not reported, which prevented the development of a routine serodiagnostic tool with a consistent and clinically acceptable diagnostic performance.

Several recombinant antigens have shown potential for CE serodiagnosis [9]. In this regard, we recently proposed the use of a C-terminal truncated recombinant antigen B2 (B2t) for the diagnosis and monitoring of CE patients by ELISA. Indeed, this B2t-ELISA showed excellent diagnostic accuracy (91.2% sensitivity and 93% specificity), and had the potential to signal cure in surgically treated CE patients [10]. This study was performed on CE patients with no indication of the above-mentioned variables, except for cyst localization.

Several studies, such as the recent one by Valiente-Gabioud *et al.* [11] on a specific *Trypanosoma cruzi* antigen, showed that an increase in the number of repetitive units of an antigen could result in an enhanced antigenic response. Because the use of the B2t

## Author Summary

Cystic echinococcosis (CE) is a widespread zoonotic disease. Its complex clinical presentation precludes a “one-size-fits-all” approach to clinical management, particularly with regard to serodiagnosis. While CE is often detected incidentally by imaging, imaging findings may be inconclusive. Therefore, there is a need for standardised and approachable diagnostic tools that may complement imaging data. In this regard, serological tests based in the use of native antigens like hydatid fluid present a low specificity and sensitivity. Although recombinant antigens with potential to replace native antigens have been proposed in the literature, none has been systematically tested for diagnostic performance. Here, we describe the new recombinant antigen 2B2t, derived from the previously described recombinant B2t, and determine its usefulness for the serodiagnosis of CE by ELISA in patients with a complete set of clinical data. The influence of clinical variables on the performance of 2B2t was evaluated and compared with the hydatid fluid (the most commonly used antigen for CE serology) and a commercial diagnostic kit based on the haemagglutination reaction. Our results show that the 2B2t antigen has potential to be routinely used for the standardised diagnosis of CE in clinical settings.

antigen gave rise to some false-negative results, we thought to use the same antigen, but with a variable number of tandem repeats. Therefore, we collected sera from several CE patients, as well as complete information on the variables listed above with the potential to affect the results of the tests. The capacity of the recombinant antigens obtained to diagnose CE was assessed by ELISA and compared with each other and with the HF antigen. Finally, the diagnostic performance of the new antigens was compared to that of their corresponding commercial indirect haemagglutination (IHA) kit, using serum from the same CE patients.

## Methods

### Antigens

Crude sheep HF collected from fertile hydatid cysts and containing viable protoscolexes was kindly provided by S. Jiménez (Servicio de Seguridad Alimentaria y Sanidad Ambiental, Consejería de Salud de La Rioja, Spain). The HF was centrifuged at 1,000 g for 5 min, and the protein concentration in the supernatant was measured with the Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce). The supernatant was then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

The B2t recombinant antigen was obtained as described before [10]. Briefly, the coding sequence of antigen B2 (GenBank entry number U15001) was cloned in the pGEX-4T2 expression vector, excluding the region coding for the signal peptide (GE Healthcare Life Sciences). This construct was then used to transform BL21-CodonPlus-RIL competent cells, derivative of *Escherichia coli* (Stratagene). Protein expression and purification were carried out as described before [10].

Three molecules with a variable number of tandem repeats (2B2t, 4B2t and 8B2t containing two, four and eight B2t subunits, respectively) were synthesised based on the original B2t recombinant antigen, as described before [12], albeit with minor modifications. Briefly, a pair of PCR primers spanning the whole B2t-pGEX-4T2 sequence (except for the terminal codon) were designed. They also included restriction sites for *Bgl*II and *Bam*HI in the 5'- and 3'-ends, respectively, which are marked in italics in

the following sequences: forward primer 5'- ACAGATCTAAA-GATGAGCCAAAAGC and reverse primer 5'- ATG-GATCCCTTTGAAATCATCATC. The PCR was carried out in a Techne T-512 thermocycler, for 35 cycles. The five first cycles consisted of 40 sec at  $94^{\circ}\text{C}$ , 40 sec at  $48^{\circ}\text{C}$  and 1 min at  $72^{\circ}\text{C}$ , and the next 30 cycles consisted of 40 sec at  $94^{\circ}\text{C}$ , 40 sec at  $58^{\circ}\text{C}$  and 1 min at  $72^{\circ}\text{C}$ . The PCR product was then purified with the Strataprep DNA Gel Extraction Kit (Stratagene) and inserted into the pGEM-T Easy vector (Promega), which contains a restriction site for *Sac*I, downstream of the cloning site. Subsequently, the recombinant vector was subjected to two double digestions in parallel, one with *Bam*HI and *Sac*I, resulting in the linearisation of the construct, and another one with *Bgl*II and *Sac*I, to obtain the fragment corresponding to the B2t coding sequence. Both products were then ligated, which led to the ligation of the *Bgl*II and *Bam*HI restriction sites, and resulted in the loss of the restriction sites ligating the 2B2t molecules. This step was repeated to obtain the 4B2t and 8B2t molecules. The resulting tandem repeat constructs of 446, 874 and 1,738 base pairs, respectively, were sequenced to check for ligations and open reading frames. The three constructs were then excised from the pGEM-T Easy vector with *Eco*RI and subcloned in the pGEX-4T1 expression vector. Expression and purification of the corresponding proteins was performed as described before [10]. The purity and yield of each protein obtained after purification and thrombin cleavage of the respective GST-fused proteins were assessed in 12% polyacrylamide gels using Coomassie blue staining. The densitometry was calculated with the ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

### Ethics statement

For this study, the serum of CE patients and healthy donors was used (see next section). The study was approved by the ethics committees of the University Hospitals of Salamanca and Valladolid, Spain, and the main IRB of Cayetano Heredia University of Lima, Peru.

All subjects gave their informed written consent, which specified that these samples could be used for future analyses.

### Serum

103 Spanish sera were used to test the diagnostic value of the three tandem repeat B2t recombinant proteins, and to compare it to that obtained with the original B2t and HF antigens. The individuals comprised 49 healthy donors and 54 patients with surgically confirmed CE, selected for their previously known reactivity to the B2t recombinant antigen by ELISA (12 B2t-negative and 42 B2t-positive; unpublished data).

Further characterization of the recombinant B2t and 2B2t antigens was performed using the serum of 186 Peruvian patients with CE confirmed surgically and/or by imaging. The clinical characteristics of the patients are presented in Table 1. They were recruited in the INPACCE (Lima, Peru) from 2007 to 2008, if they had clinical findings compatible with CE and were living in endemic (34%) and non-endemic (66%) areas for CE. Additionally, the serum of 110 healthy donors, 36 patients with hepatitis (both groups recruited in the Hospital of Salamanca, Spain) and 138 patients with related parasites confirmed by microscopy or specific ELISA or immunoblot assay (70 patients with neurocysticercosis, including 57 Peruvian patients with neurological symptoms and living in endemic areas for cysticercosis recruited in the Institute for Neurological Science (Lima, Peru) in 2007 and 13 Mexican patients; 57 Swiss patients with alveolar echinococcosis; and 11 Peruvian patients with taeniosis) were tested.

**Table 1.** Characteristics of the CE patients from Peru.

<b>CE diagnosis</b>	
Surgery	134 (72.0%)
Imaging	52 (28.0%)
<b>Gender</b>	
Male	85 (45.7%)
Female	101 (54.3%)
<b>Number of cysts</b>	
Single	108 (58.1%)
Multiple	78 (41.9%)
<b>Cyst localisation</b>	
Liver	65 (34.9%)
Lung	86 (46.2%)
Liver plus lung	24 (12.9%)
Other	11 (6.0%)
<b>Cyst classification*</b>	
CE1	44 (49.4%)
CE2	22 (24.7%)
CE3	8 (9.0%)
CE4	2 (2.2%)
NS	13 (14.7%)
<b>Complicated CE<sup>#</sup></b>	
No	87 (46.8%)
Yes	98 (52.7%)
NS	1 (0.5%)
<b>First CE</b>	
Yes	20 (10.7%)
No	166 (89.3%)
<b>Serum collection</b>	
Before treatment	129 (69.3%)
After treatment	57 (30.7%)

Data are shown as total number and percentage (%) for each subgroup.

\*For liver cysts only, according to the WHO classification (2003).

<sup>#</sup>According to Beggs (1985). NS: not stated.

doi:10.1371/journal.pntd.0001714.t001

## Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect haemagglutination test (IHA)

The sera and antigens were tested by IgG ELISA, as described before [10]. Briefly, 96-well polystyrene plates (Corning, Madrid, Spain) were coated overnight at 4°C with the B2t, 2B2t, 4B2t or 8B2t recombinant proteins (0.5 µg/ml) or with HF (5 µg/ml) in carbonate buffer, pH 9.6 (100 µl/well). The plates were then washed six times with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) plus 0.05% Tween 20 (washing buffer) and incubated for 1.5 h at 37°C with 200 µl of washing buffer plus 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma Aldrich, Madrid, Spain) (blocking buffer). Then, the sera were added in duplicate (100 µl/well) at 1:200 dilution in blocking buffer, and the plates were incubated for 1 h at 37°C. The plates were washed again, and the secondary antibody (peroxidase-labelled rabbit anti-human IgG; Sigma Aldrich, Madrid, Spain) was added at a 1:2000 dilution in blocking buffer (100 µl/well), and incubated for 1 h at 37°C. After washing, the plates were stained with 100 µl/well of citrate buffer pH 5 plus orthophenylene diamine (0.28 mg/ml; Sigma Aldrich, Madrid, Spain) and hydrogen peroxide (0.4 µl/ml; Sigma Aldrich, Madrid, Spain). The

reaction was stopped with 50 µl/well of 3 N sulfuric acid, and the plates were read at 492 nm with an ELISA reader instrument (STL 340 ATC reader, Lab Instruments, Salzburg, Germany).

The IHA kit (Hydatidose Fumouze Kit, Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret, France) was applied to the above-mentioned sera, according to the manufacturer's instructions. Briefly, the sera were diluted at 1:40 in the serum diluter from the kit. This solution was used to obtain two-fold serial dilutions of each serum, as indicated by the supplier, in round-bottom plates. Then, a drop of sensitized red cells was added to each well, and the plates were incubated at room temperature for two hours. Subsequently, the agglutination reactions were interpreted according to the manufacturer's instructions. Thus, the sera were considered positive when agglutination was observed at  $\geq 1:320$  dilutions (cut-off value of 1:320). An agglutinin control was performed for several randomly selected sera, as recommended by the manufacturer.

## Statistics

The serological activity index was calculated for each optical density and used to establish a common cut-off value for all the ELISAs performed for each antigen, using the following formula:  $[(NC-S)/(NC-PC)]*100$ , where *NC* and *PC* are the negative and positive controls, respectively, and *S* stands for each serum. The best cut-off value was then determined by receiver operator characteristic (ROC) analysis for each antigen. For the determination of that value, sera from the 186 Peruvian CE patients were considered true positive and 110 sera from donors plus 174 sera from patients with other diseases were considered true negative.

A chi-square test was used to compare the sensitivity of the B2t, 2B2t and HF antigens for the detection of total IgG by ELISA, in groups of CE patients with different clinical and cyst-related characteristics, which could influence the resulting sensitivity. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant. Additionally, two different statistical approaches were used to evaluate the influence of the different clinical variables on the diagnostic performance of the different tests. First, a bivariate binary logistic regression was performed to calculate the odd ratio (OR) for each pair of clinical variables, and identify those associated with test performance. Then, the significant variables were further analysed by multivariate binary logistic regression, to identify those independently associated with the performance of each serological test, taking into account the simultaneous participation of the other variables. All statistical analyses were performed with SPSS v.19 (www.ibm.com).

## Results

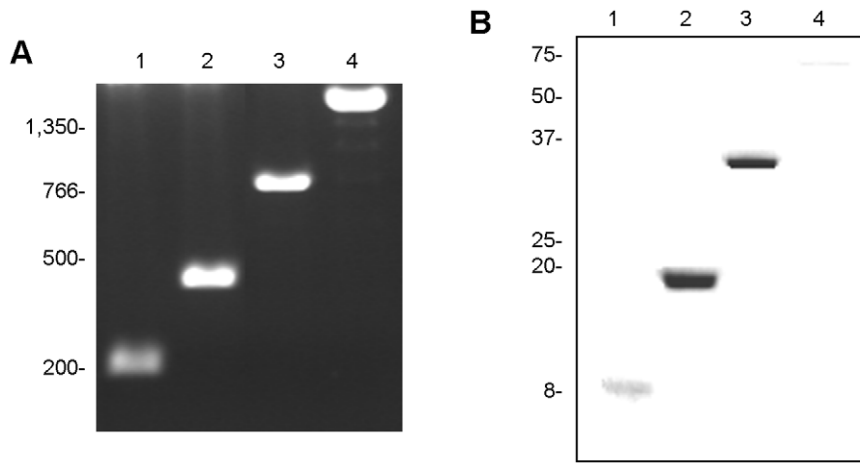
### Recombinant antigens

The tandem ligation of the B2t nucleic acid sequence of 213 base pairs (bp) resulted in three products of 446, 874 and 1,738 bp, corresponding to the 2B2t, 4B2t and 8B2t antigens, respectively (Figure 1A). The B2t, 2B2t, 4B2t and 8B2t recombinant proteins were obtained as described previously [10], by thrombin cleavage of the respective GST-fused products, resulting in polypeptides with molecular weights of 8.3, 16.9, 31.3 and 60.1 kDa, as expected, and with high purity and no degradation (Figure 1B). After purification (Fig. 1B), the highest yield was obtained for the 2B2t, followed by 4B2t, B2t and 8B2t proteins. The production of the 8B2t protein was too low and was therefore disregarded.

The 2B2t recombinant antigen was patented (P201030983).

### Usefulness of the B2t-derived recombinant antigens for the serodiagnosis of CE

**Comparison with a commercial IHA kit.** The preliminary assessment of the diagnostic performance of the recombinant B2t,



**Figure 1. Cloning and production of the B2t (1), 2B2t (2), 4B2t (3) and 8B2t (4) recombinant proteins.** (A) 1% agarose gel stained with ethidium bromide and (B) 15% acrylamide gel stained with Coomassie blue, showing the polynucleotides and purified recombinant proteins. The molecular weights are indicated in base pairs (A) and kilodaltons (B): (1) B2t 213 pb, 8.3 kDa; (2) 2B2t, 446 pb, 16.9 kDa; (3) 4B2t, 874 pb, 31.3 kDa and (4) 8B2t, 1,738 pb, 60.1 kDa. In (B), 10 µl of the supernatant of each recombinant protein purified from 1 litre of culture was loaded to compare the final concentration of each recombinant protein obtained from the same volume of culture.  
doi:10.1371/journal.pntd.0001714.g001

2B2t and 4B2t proteins ELISA was performed using the serum of 49 healthy donors and 54 patients with confirmed CE, selected for their previously known reactivity to the B2t recombinant antigen. As shown in Table 2, the highest sensitivity was obtained with the 2B2t antigen (92.6%), followed by the HF (81.5%) and the 4B2t antigens (79.6%). Both the 2B2t and 4B2t antigens showed a higher sensitivity than the B2t antigen in this analysis (77.8% sensitivity). The specificity obtained in the serum of the 49 healthy donors with the 4B2t antigen was only of 79.6%, and was thus lower than the specificity obtained with the HF (93.9%) and the two other recombinant antigens (95.9%). The difference in sensitivity observed between the 2B2t antigen and the HF, B2t and 4B2t antigens was statistically significant in each case. However, the difference in specificity was only statistically significant when comparing the 2B2t antigen with the 4B2t antigen (see Table 2).

Because of its low specificity, the 4B2t antigen was discarded from further studies, and the subsequent analyses thus focused on the B2t and 2B2t antigens.

Then, the serum of 186 Peruvian patients with confirmed CE, 110 healthy donors and 174 patients with different infectious diseases was used to compare the usefulness of the 2B2t recombinant antigen with that of the B2t and HF antigens by ELISA and by IHA with a commercial kit (Fumouze Diagnostics,

Levallois-Perret, France), based on the detection of specific serum antibodies against a purified fraction of the *E. granulosus* antigen 5.

The results obtained with the 186 Peruvian CE patients are shown in Table 3, specifically sensitivities of 83.3%, 79% and 87.6% for the HF, B2t and 2B2t antigens, respectively, and of 34.9% were found when using the IHA kit. For the 2B2t-ELISA, only 5.9% of the sera from CE patients was close ( $\pm 5$  SI units) to its cut-off value. The difference in sensitivity between the 2B2t-ELISA and each of the other three tests was statistically significant. The evaluation of the four diagnostic tools using serum from healthy donors showed that the IHA was the most specific test, followed by the B2t- and 2B2t-ELISA, and the HF-ELISA (Table 3). The difference between the 2B2t-ELISA and HF-ELISA was statistically significant. The most significant cross-reactivity was detected in NCC Peruvian patients for the 2B2t antigen, although two of them also showed a positive immunoblot against HF (data not shown), suggesting that they could actually suffer from CE. Strikingly, no cross-reactivity was noted with the 2B2t-ELISA in 13 NCC Mexican patients (Table 3). The difference in cross-reactivity was statistically significant between the 2B2t-ELISA and each of the other three tests.

Several variables that could potentially affect the sensitivity of the tests with the different in-house antigens and the commercial IHA kit were analysed. These variables included the number of

**Table 2. Comparative analysis of the diagnostic performance of four different antigens in ELISA.**

	CE Confirmed cases, n = 54 (Sensitivity)			Healthy donors, n = 49 (Specificity)
	Overall (n = 54)	B2t negative (n = 12)	B2t positive (n = 42)	
HF	44 (81.5%*)	4 (33%)	40 (95.2%)	46 (93.9%)
B2t	42 (77.8%*)	0 (0%)	42 (100%)	47 (95.9%)
2B2t	50 (92.6%)	9 (75%)	41 (97.6%)	47 (95.9%)
4B2t	43 (79.6%*)	3 (25%)	40 (95.2%)	39 (79.6%*)

The antigens tested were: hydatid fluid (HF), B2t, 2B2t and 4B2t recombinant proteins. IgG specific antibodies were investigated in patients with cystic echinococcosis (CE) and healthy donors. n = number of samples.

\*indicates significant differences between the HF, B2t or 4B2t and 2B2t-ELISA.

doi:10.1371/journal.pntd.0001714.t002

**Table 3.** Sensitivity, specificity and cross-reactivity of four different diagnostic tools.

	HF-ELISA	B2t-ELISA	2B2t-ELISA	IHA
<b>CE Confirmed cases, n = 186 (Sensitivity)</b>	155 (83.3%*)	147 (79.0%*)	163 (87.6%)	65 (34.9%*)
<b>Healthy donors, n = 110 (Specificity)</b>	5 (95.4%*)	1 (99.1%)	1 (99.1%)	0 (100%)
<b>Cross Reactions (n = 174)</b>				
AE (n = 57)	57 (100%)	7 (12.3%)	10 (17.5%)	24 (42.1%)
NCC Mexico (n = 13)	7 (53.8%)	1 (7.7%)	0 (0%)	0 (0%)
NCC Peru (n = 57)	22 (38.6%)	14 (24.6%)	21 (36.8%)	1 (1.7%)
Taeniasis Peru (n = 11)	4 (36.4%)	1 (9.1%)	2 (18.2%)	0 (0%)
Hepatitis (n = 36)	0 (0%)	1 (2.8%)	1 (2.8%)	1 (2.8%)
Overall cross-reactions (n = 174)	90 (51.7%*)	24 (13.8%*)	34 (19.5%)	26 (14.9%*)

The diagnostic performance of the tools B2t-, 2B2t- and hydatid fluid (HF)-ELISA, and a commercial indirect haemagglutination test (IHA), were compared using a panel of sera from cystic echinococcosis (CE) patients, healthy donors and patients with other diseases (see below). The results are shown as the number of positive results against the different tools and the corresponding sensitivity, specificity and cross-reactivity for each group. Under "Cross Reactions": AE: alveolar echinococcosis; NCC MEX: neurocysticercosis Mexico; NCC PERU: neurocysticercosis Peru. n: number of samples.

\*indicates significant differences between the HF-ELISA, B2t-ELISA or IHA tests and the 2B2t-ELISA.

doi:10.1371/journal.pntd.0001714.t003

cysts (one or more), localization (liver or lung), WHO ultrasound classification (liver cysts were grouped into two subgroups, i.e., CE1, and CE2 to CE4, to have a representative number of cases in each subgroup), CE complications (ruptured cyst, in 51 patients, or infected cyst, in 47 patients), CE antecedents and date of serum collection *vs.* date of treatment onset (of the 57 patients whose serum was collected after treatment onset, 55 were surgically treated and two were only treated with albendazole). First, a chi squared test was used to calculate the sensitivity of the tests for each variable, without considering the potential influence of the others. The results from this analysis are shown in Table 4. The sensitivity of the test with the HF antigen was shown to be affected by a higher number of variables as compared to the recombinant antigens, including the number of cysts and their localisation and classification, CE antecedents, complications and the collection of serum before or after treatment. Similarly, the results obtained with the IHA kit were affected by all variables, except for CE antecedents. The sensitivity of the test with the B2t antigen was affected by the number of cysts and the date of serum collection. Indeed, the screening of patients with a single cyst was more frequently negative than that of patients with more multiple cysts, and serum collection after treatment was associated with an increased probability of presenting a positive result by B2t-ELISA. The performance of the 2B2t recombinant protein was only affected by one variable (the number of cysts), and showed a lower number of positive results in patients with a single cyst than in those with multiple cysts ( $P < 0.05$ ). The time of serum collection, i.e., before or after surgical treatment, which affected the performance of the test using the B2t antigen, did not affect the performance of the test using the 2B2t antigen. However, the influence of other treatments should be further investigated. A higher number of positive patients was consistently detected with the 2B2t than with the HF or B2t antigens in all groups.

The influence of complications was also assessed by separating the complicated group into two subgroups, i.e., those with ruptured cysts or infected cysts. Among the 98 patients with complications, 51 (52%) had ruptured cysts and 47 (48%) had infected cysts. The difference in the number of positive results between the two subgroups was not statistically significant for any of the antigens tested (data not shown).

The results of the bivariate analysis, which was used to compare the results obtained with each test and to assess the influence of

different clinical variables are shown in Table 5. The IHA test was the one affected by the highest number of variables. Indeed, the presence of more than one cyst, of complications, of cysts in the lungs, and serum collection after treatment were significantly associated with a higher probability of positive result with the IHA test. This higher probability was also observed by multivariate analysis ( $P < 0.05$ ; Table 5). On the other hand, CE2 to CE4 cysts, CE complications and serum collection after treatment were significantly associated with a higher probability of positive result with the HF-ELISA. These associations were maintained in the multivariate analysis ( $P < 0.05$ ; Table 5). Regarding the recombinant antigens, a higher probability of positive result was noted in the presence of multiple cysts (for B2t and 2B2t) and serum collection after treatment (for B2t; Table 5). However, only the presence of multiple cysts remained statistically significant in the multivariate analysis for B2t ( $P < 0.05$ ), but not serum collection after treatment ( $P = 0.053$ ). In addition, the presence of multiple cysts was not associated with a higher probability of positive result with 2B2t ( $P = 0.064$ ).

## Discussion

Our findings show that the new 2B2t-ELISA performs better than that of the HF- and B2t-ELISA, and also than that of a commercial haemagglutination test. As both the in-house HF-ELISA and the IHA commercial kit are frequently used for the serodiagnosis of CE patients in clinical settings, the 2B2t-ELISA could represent a good alternative as a routine test for CE serology.

The previously described B2t recombinant antigen [10] was used as the base for constructing the three tandem repeat antigens constituted by two, four and eight subunits. This approach was chosen based on the results of other studies showing an increase in antigenicity when two or more subunits of a specific antigen were cloned together and used for the diagnosis of specific diseases (e.g., leishmaniasis and trypanosomiasis) [11,13]. This increase in reactivity correlated with the increase in number of repeats in the recombinant proteins studied, and that was also shown here for the 2B2t antigen compared with the B2t antigen. In the present study, surprisingly, the 4B2t antigen was revealed to be less reactive than the recombinant 2B2t antigen, although the latter contained a lower number of B2t subunits than the 4B2t antigen.

**Table 4.** Influence of clinical variables on the diagnostic sensitivity of four different serodiagnostic tools ( $\chi^2$ ).

		HF-ELISA		B2t-ELISA		2B2t-ELISA		IHA	
		Positive	P	Positive	P	Positive	P	Positive	P
<b>NUMBER OF CYSTS</b>	<b>Single (n = 108)</b>	85 (78.7%)	<b>0.046</b>	78 (72.2%)	<b>0.007</b>	90 (83.3%)	<b>0.036</b>	26 (24.1%)	<b>0.000</b>
	<b>Multiple (n = 78)</b>	70 (89.7%)		69 (88.5%)		73 (93.6%)		39 (50.0%)	
<b>CYST LOCALISATION</b>	<b>Liver (n = 65)</b>	48 (73.8%)	0.060	49 (75.4%)	0.716	57 (87.7%)	0.385	11 (16.9%)	<b>0.002</b>
	<b>Lung (n = 86)</b>	74 (86.0%)		67 (77.9%)		71 (82.5%)		35 (40.7%)	
<b>WHO CLASSIFICATION*</b>	<b>CE1 (n = 44)</b>	29 (65.9%)	<b>0.012</b>	31 (70.4%)	0.078	39 (88.6%)	1.000	6 (13.6%)	<b>0.032</b>
	<b>CE2 to CE4 (n = 32)</b>	29 (90.6%)		28 (87.5%)		29 (90.6%)		11 (34.4%)	
<b>COMPLICATIONS</b>	<b>No (n = 87)</b>	65 (74.7%)	<b>0.003</b>	65 (74.7%)	0.186	74 (85.0%)	0.330	18 (20.7%)	<b>0.000</b>
	<b>Yes (n = 98)</b>	89 (90.8%)		81 (82.6%)		88 (89.8%)		46 (46.9%)	
<b>FIRST CE</b>	<b>Yes (n = 20)</b>	20 (100%)	<b>0.028</b>	17 (85.0%)	0.771	19 (95.0%)	0.476	10 (50.0%)	<b>0.135</b>
	<b>No (n = 166)</b>	135 (81.3%)		130 (78.3%)		144 (86.7%)		55 (33.1%)	
<b>SERUM COLLECTION</b>	<b>Before tr. (n = 129)</b>	100 (77.5%)	<b>0.001</b>	96 (74.4%)	<b>0.020</b>	111 (86.0%)	0.322	35 (27.1%)	<b>0.001</b>
	<b>After tr. (n = 57)</b>	55 (96.5%)		51 (89.5%)		52 (91.2%)		30 (52.6%)	

The diagnostic sensitivity of hydatid fluid (HF)-, B2t- and 2B2t-ELISA, and a commercial IHA kit were compared regarding different clinical variables in a panel of cystic echinococcosis patients. Differences are considered significant if  $P \leq 0.050$  (in bold). The results are shown as the number of positive samples and corresponding sensitivity (%) against the different antigens.

\*refers to liver cysts only. tr: treatment.

doi:10.1371/journal.pntd.0001714.t004

This could be due to a conformation of the 4B2t protein unfavourable for antibody binding, compared to that of the 2B2t antigen. Indeed, the three-dimensional structure could have resulted in the loss of some conformational epitopes needed for antibody binding.

The higher number of antigenic units also resulted in a lower specificity for the 4B2t-ELISA, which presented a high number of false-positive results in healthy donors than the B2t-ELISA, while the 2B2t-ELISA showed the same specificity than the B2t-ELISA. This loss of specificity associated with the increase in the number of antigenic repeat units has been shown before for other recombinant antigens (e.g., [13]). The cross-reactivity of the 2B2t antigen increased more markedly, as compared to that of the B2t antigen when using serum from Peruvian patients with NCC. The western blot against 8, 16 and 21 kDa HF antigens was only positive in one of the cross-reactive Peruvian patients, and no correlation was found between a higher number of positive bands in the NCC-specific western blot and 2B2t cross-reactivity. Nevertheless, the absence of cross-reactivity in NCC patients from Mexico seemed to indicate the potential presence of true anti-*E. granulosus* antibodies in the NCC Peruvian samples. This could be explained by higher human prevalence of CE (5.5–9.1% in endemic villages) [14], than in Mexico. In fact, autochthonous Mexican CE cases are regarded as rare [15]. Because the serum donors were recruited in an area with a low endemicity for CE (Salamanca, Spain), the potential cross-reactivity detected in Peruvian patients should be further investigated with a panel of donors from the same area as the NCC patients.

The commercial IHA kit proved to be highly specific, but a high cross-reactivity was detected with the serum from AE patients. The cross-reactivity of antigens usually used for the serodiagnosis of CE with alveolar echinococcosis (AE) is a serious drawback for the specific diagnosis of CE in areas where both parasites co-exist [8,9]. In this regard, the ability of the new 2B2t antigen to discriminate between patients with CE and AE is very interesting.

In spite of the higher sensitivity of the 2B2t-ELISA, which was the best of the four tests assessed here, a percentage of CE confirmed that patients from our cohort still showed negative

results with the 2B2t-ELISA. Frequently, studies intending to validate serodiagnostic tools for CE fail to consider several clinical variables that could affect the diagnostic performance of these tools. In addition, serum selection is sometimes based on previous serologic information. As a consequence, divergent results are reported for the same test, e.g., ranging from 45 to 93% with the same recombinant antigen B2 in IgG-ELISA [9]. False-negative results could then be due to clinical features influencing the level of specific circulating antibodies against defined antigens [4]. This has been shown for several variables; among them, the date of serum collection (relative to treatment initiation), as both pharmaceutical and surgical treatments can lead to a rise in the level of specific antibodies (e.g., [16]), the cyst stage (e.g., [17]), cyst localization (e.g., [18]) and the number of cysts (e.g., [19,20]).

Here, we examined the influence of six different clinical variables on the performance of the tests: the number of cysts, cyst localization, cyst stage, the presence of complications, CE antecedents, and date of serum collection (compared to that of treatment onset). Regarding cyst classification, because the number of samples in our study for some types of cysts was too low for statistical analysis (44 patients with CE1, 22 patients with CE2, eight patients with CE3 and two patients with CE4), especially those belonging to the inactive (CE4-CE5) group, we could not group our patients into active, transitional and inactive groups in the attempt to relate cyst activity with the corresponding serological result. In this regard, the shift from active to inactive cysts has been shown to result in a decline of specific antibodies against the recombinant antigen B (e.g., [21]). Also related to this, the expression of the antigen B2 subunit has been shown to reduce with the senescence of cysts [22]. Therefore, we are aware that the performance of our antigens should be further investigated in a larger group including a higher number of patients with CE3, CE4 and CE5 cysts, preferably in a prospective follow-up trial. Nevertheless, CE1 cysts have also been shown to be more frequently associated with a seronegative response against parasite antigens, including antigen B, in contrast with the CE2 and CE3 types of cysts that are usually associated with a detectable and specific antibody response (e.g., [17,21]). Thus, we decided to



**Table 5.** Influence of defined clinical variables on the results of four different diagnostic tools (logistic regression).

	HF-ELISA			B2t-ELISA			2B2t-ELISA			IHA		
	B-OR (IC)	M-OR (IC)		B-OR (IC)	M-OR (IC)		B-OR (IC)	M-OR (IC)		B-OR (IC)	M-OR (IC)	
<b>NUMBER OF CYSTS</b>												
Single	1	--	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Multiple	2.4 (1.0–5.6)	--		<b>2.9 (1.3–6.6)</b>	<b>2.7 (1.2–6.2)</b>		<b>2.92 (1.03–8.24)</b>	2.7 (0.9–7.7)		<b>3.1 (1.7–5.9)</b>	<b>3.0 (1.5–5.9)</b>	
<b>CYST LOCALISATION</b>												
Liver	1	--	1	1	--	1	1	--	1	1	1	1
Lung	2.2 (1.0–5.0)	--		1.1 (0.5–2.5)	--		0.66 (0.26–1.70)	--		<b>3.4 (1.5–7.3)</b>	<b>2.7 (1.1–6.8)</b>	--
<b>WHO CLASSIFICATION*</b>												
CE1	1	1	1	1	--	1	1	--	1	1	--	--
<b>CE2 to CE4</b>	<b>4.0 (1.0–15.5)</b>	<b>6.6 (1.1–38.5)</b>		2.2 (0.6–8.0)	--		1.05 (0.23–4.83)	--		2.2 (0.6–8.2)	--	--
<b>COMPLICATIONS</b>												
No	1	1	1	1	--	1	1	--	1	1	1	1
Yes	<b>3.3 (1.4–7.7)</b>	<b>2.4 (1.0–5.8)</b>		1.6 (0.8–3.3)	--		1.55 (0.64–3.73)	--		<b>3.4 (1.8–6.5)</b>	<b>2.9 (1.5–5.9)</b>	
<b>FIRST CE</b>												
Yes	1	--	1	1	--	1	1	--	1	1	--	--
No	3.7 (0.0)	--		1.6 (0.4–5.6)	--		2.90 (0.37–22.78)	--		2.0 (0.8–5.1)	--	--
<b>SERUM COLLECTION</b>												
Before tr.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
After tr.	<b>8.0 (1.8–34.7)</b>	<b>6.6 (1.5–29.1)</b>		<b>2.9 (1.1–7.4)</b>	2.6 (1.0–6.7)		1.69 (0.59–4.79)	--		<b>3.0 (1.6–5.7)</b>	<b>2.6 (1.3–5.1)</b>	

The association and influence of the clinical variables enumerated in the first column on the sensitivity of the hydatid fluid (HF)-, B2t- and 2B2t-ELISAs and of a commercial IHA kit was statistically assessed. B-OR: odds ratio in the bivariate, and M-OR in the multivariate regression analysis. IC: 95% confidence interval. Statistically significant differences ( $P \leq 0.050$ ) are shown in the table (in bold). tr: treatment. doi:10.1371/journal.pntd.0001714.t005

group our patients into two groups: CE1 and CE2 to CE4, and determine if the results of the tests depended on this variable.

All variables studied here (except one) influenced the sensitivity of the HF-ELISA, as observed by chi squared analysis. A very similar result was noted with the IHA commercial test. The B2t-ELISA was influenced by the number of cysts and date of serum collection (compared to that of treatment onset), while the 2B2t-ELISA was only influenced by the number of cysts.

Strikingly, patients with cysts in the lungs were more frequently positive with the IHA kit and HF-ELISA than patients with cysts in the liver. This contradicts the reports of other authors, who showed that cysts in the lungs usually result in a lower antigenic stimulation than cysts in the liver (e.g., [18]). Nevertheless, these differences could be attributed to the influence of other clinical variables. In our group of patients, 66% of cysts in the lungs led to complications, compared to 27% for cysts in the liver, in both localizations at 1:1 proportion regarding ruptured and infected cysts. Then, the presence of complicated cysts could specifically account for a higher seropositivity influencing the test results, as noted with the IHA kit and HF-ELISA. These observations prompted us to perform a multivariate statistical analysis to assess the influence of all variables together.

The results of the logistic regression indicated that four and three of six variables affected the outcome of the IHA kit and HF-ELISA, respectively, in association or not with the other variables. The results of the B2t-ELISA were influenced by the number of cysts. Thus, a patient with a single cyst is more likely to test negative at B2t than a patient with multiple cysts. On the other hand, the performance of the 2B2t-ELISA was statistically independent from all the clinical variables evaluated. Thus, the percentage of negative patients with a confirmed CE could be attributed to the absence of specific antibodies associated with variables not evaluated in this study, either clinical or other, e.g., the formation of immune complexes.

Nevertheless, although the better sensitivity of the 2B2t antigen over that of B2t resulted in a loss of statistically significant difference for some clinical variables, we are aware that the inclusion of a higher number of patients could result in a statistically significant association for some of the variables tested, especially for those showing a broad 95% confidence interval. Thus, our results suggest that multiple cysts, localisation in the liver *vs.* the lung, CE2 and CE3 cysts or complications, and serum collection after treatment onset are variables that increase the probability of a positive result with the 2B2t-ELISA.

Considering the patients who tested negative with the 2B2t-ELISA ( $n = 23$ ), 78% had a single cyst, 65% had cysts in the lungs, 62.5% had CE1 types of cysts, 56% suffered from complications, and 78% provided a sample before initiation of the treatment. Unfortunately, the number of patients with negative serology was too low to draw any significant conclusion. Nevertheless, we could assume that a patient with an ultrasound image suggestive of CE, but presenting a single CE1 uncomplicated cyst located in the

lungs, and whose was taken prior to the administration of any treatment, would probably yield a false-negative result with the 2B2t-ELISA.

A striking example of how the results of a given test can change depending on the characteristics of a patient, was shown in the high difference in specificity observed for the B2t-ELISA between the present study and the assessment performed previously [10]. In this previous study, the serum of 102 Spanish CE patients was analyzed, and a sensitivity of 91.2% was obtained with the B2t-ELISA. When the new 2B2t antigen was tested using the serum of these 102 patients, a sensitivity of 94.1% was obtained (data not shown). Unfortunately, the clinical data available from these patients was scarce. Thus, this higher sensitivity cannot be attributed to specific variables. Similarly, the results obtained by other authors using the recombinant antigen B2 for the detection of specific IgG in ELISA show highly variable sensitivities, ranging from 45% to 93% [9]. From these studies, the sensitivities reported by Rott et al. [23] and Virginio et al. [24] are the most similar to the sensitivity found here for the B2t and 2B2t recombinant antigens. Unfortunately, further comparison between our results and those obtained in these studies is difficult, as previously discussed [10], for a number of reasons, among which missing clinical information on the patients used by these authors. Nevertheless, these differences indicate the need to reach a consensus to determine the variables to be checked when using a serodiagnostic tool for CE. In addition, it is best to use the same samples to compare different serological tools [25]. Short of this, there are few chances that a better test to detect specific antibodies in CE patients, which could replace the very variable and clearly improvable tests based on the use of native antigens, can be developed.

In spite of its limitations, to our knowledge this is the first attempt to take into account some of the variables of the extremely complex clinical presentation of human CE [26] in the evaluation of several serological tests. We also show that the performance of a serological test with a defined and specific recombinant antigen can be improved by using two units of that antigen in a tandem construct.

## Acknowledgments

We would like to thank Dr T. Gárate (ISCIH, Spain) and B. Gottstein (Institute of Parasitology, Berne, Switzerland) for kindly providing samples of Mexican NCC and AE patients.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MSL HHG SR AHG SS. Performed the experiments: MSL AHG. Analyzed the data: MSL HHG SR AHG SS AO SM GR. Contributed reagents/materials/analysis tools: MSL HHG SR AHG SS AO SM GR. Wrote the paper: MSL AHG SR HHG SS.

## References

- Romig T, Dinkel A, Mackenstedt U (2006) The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol Int* 55: 87–91.
- Dakkak A (2010) Echinococcosis/hydatidosis: a severe threat in Mediterranean countries. *Vet Parasitol* 174: 2–11.
- Rojo-Vazquez FA, Pardo-Lledias J, Francos-Von Hunefeld M, Cordero-Sanchez M, Alamo-Sanz R, et al. (2011) Cystic echinococcosis in Spain: current situation and relevance for other endemic areas in Europe. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e893.
- Moro P, Schantz PM (2009) Echinococcosis: a review. *Int J Infect Dis* 13: 125–133.
- Brunetti E, García HH, Junghans T, International CE Workshop in Lima, Peru, 2009 (2011) Cystic echinococcosis: chronic, complex, and still neglected. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1146.
- WHO Informal Working Group (2003) International classification of ultrasound images in cystic echinococcosis for application in clinical and field epidemiological settings. *Acta Trop* 85: 253–261.
- Hosch W, Junghans T, Stojkovic M, Brunetti E, Heye T, et al. (2008) Metabolic viability assessment of cystic echinococcosis using high-field 1H MRS of cyst contents. *NMR Biomed* 21: 734–754.
- Brunetti E, Kern P, Vuitton DA, Writing Panel for the WHO-IWGE (2010) Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop* 114: 1–16.
- Carmena D, Benito A, Eraso E (2006) Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. *Acta Trop* 98: 74–86.

10. Hernández-González A, Muro A, Barrera I, Ramos G, Orduña A, et al. (2008) Usefulness of four different *Echinococcus granulosus* recombinant antigens for serodiagnosis of unilocular hydatid disease (UHD) and postsurgical follow-up of patients treated for UHD. *Clin Vaccine Immunol* 15: 147–153.
11. Valiente-Gabioud AA, Veaute C, Perrig M, Galan-Romano FS, Sferco SJ, et al. (2011) Effect of repetitiveness on the immunogenicity and antigenicity of *Trypanosoma cruzi* FRA protein. *Exp Parasitol* 127: 672–679.
12. Lennick M, Haynes JR, Shen SH (1987) High-level expression of alpha-human atrial natriuretic peptide from multiple joined genes in *Escherichia coli*. *Gene* 61: 103–112.
13. Goto Y, Carter D, Guderian J, Inoue N, Kawazu S, et al. (2010) Upregulated expression of B-cell antigen family tandem repeat proteins by *Leishmania* amastigotes. *Infect Immun* 78: 2138–2145.
14. Moro PL, Budke CM, Schantz PM, Vasquez J, Santivañez SJ, et al. (2011) Economic impact of cystic echinococcosis in peru. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1179.
15. Mata-Miranda P, Osnaya-Palma I, Rodríguez-Prado U, Gutiérrez-Marín A, Tawil M, et al. (2007) Epidemiologic and ultrasonographic study of echinococcosis in a community in the state of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 77: 500–503.
16. Feng X, Wen H, Zhang Z, Chen X, Ma X, et al. (2010) Dot immunogold filtration assay (DIGFA) with multiple native antigens for rapid serodiagnosis of human cystic and alveolar echinococcosis. *Acta Trop* 113:114–120.
17. Li T, Ito A, Chen X, Sako Y, Qiu J, et al. (2010) Specific IgG responses to recombinant antigen B and em18 in cystic and alveolar echinococcosis in China. *Clin Vaccine Immunol* 17: 470–475.
18. Babba H, Messedi A, Masmoudi S, Zribi M, Grillot R, et al. (1994) Diagnosis of human hydatidosis: comparison between imagery and six serologic techniques. *Am J Trop Med Hyg* 50: 64–68.
19. Ortona E, Riganò R, Margutti P, Notargiacomo S, Ioppolo S, et al. (2000) Native and recombinant antigens in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Parasite Immunol* 22: 553–559.
20. Gavidia CM, Gonzalez AE, Zhang W, McManus DP, Lopera L, et al. (2008) Diagnosis of cystic echinococcosis, central Peruvian Highlands. *Emerg Infect Dis* 14: 260–266.
21. Li T, Ito A, Pengcuo R, Sako Y, Chen X, Qiu D, et al. (2011) Post-treatment follow-up study of abdominal cystic echinococcosis in tibetan communities of northwest Sichuan Province, China. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1364.
22. Pan D, Bera AK, Bandyopadhyay S, Das S, Rana T, et al. (2011) Molecular characterization of antigen B2 subunit in two genotypes of *Echinococcus granulosus* from Indian bubaline isolates, its stage specific expression and serological evaluation. *Mol Biol Rep* 38: 2067–2073.
23. Rott MB, Fernández V, Farias S, Ceni J, Ferreira HB, et al. (2000) Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. *Acta Trop* 75: 331–340.
24. Virginio VG, Hernández A, Rott MB, Monteiro KM, Zandonai AF, et al. (2003) A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clin. Exp. Immunol* 132: 309–315.
25. Lightowers MS, Gottstein B (1995) Echinococcosis/hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis. In: Thompson RCA, Lymbery AJ, editors. *Echinococcus and hydatid disease*. Oxon, UK: CAB International. pp. 355–410.
26. Junghans T, da Silva AM, Horton J, Chiodini PL, Brunetti E (2008) Clinical management of cystic echinococcosis: state of the art, problems, and perspectives. *Am J Trop Med Hyg* 79: 301–311.



## **Application of the recombinant antigen 2B2t in a commercial immunochromatographic test for the diagnosis of cystic echinococcosis**

A Hernandez-Gonzalez <sup>1</sup>, E Brunetti <sup>2</sup>, F Tamarozzi <sup>3</sup>, V Meroni <sup>2</sup>, F Genco <sup>2</sup>, T Junghanss <sup>4</sup>, M Stojkovic <sup>4</sup>, JM Delgado <sup>5</sup>, FM Soriano <sup>5</sup>, M Siles-Lucas <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Parasitology Group, IRNASA, National Research Council, 37008 Salamanca, Spain.

<sup>2</sup>Department of Infectious Diseases, San Matteo Hospital Foundation, WHO Collaborating Centre for Clinical Management of Cystic Echinococcosis, University of Pavia, Pavia 27100, Italy. <sup>3</sup>Molecular and Biochemical Parasitology Group. Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place L35QA, Liverpool, UK. <sup>4</sup>Section of Clinical Tropical Medicine, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany.

<sup>5</sup>Vircell S.L., Pol. Ind. Dos de Octubre, Plaza Domínguez Ortiz 1, 18320 Santa Fé, Granada, Spain.

Corresponding author: M. Siles-Lucas. Parasitology Group, IRNASA, National Research Council, 37008 Salamanca, Spain. Email: [mmar.siles@irnasa.csic.es](mailto:mmar.siles@irnasa.csic.es)

## **ABSTRACT**

A new recombinant antigen called 2B2t, constructed by cloning tandems of two units of the antigen B2t has been applied in an immunochromatographic test based on the detection of specific serum antibodies for the diagnosis of cystic echinococcosis (CE), in collaboration with the biotechnology company Vircell. This test was compared with the VIRapid® HYDATIDOSIS test containing native antigens, using a panel of 385 sera from patients with CE, 36 sera from healthy donors, and 54 sera from patients with other parasitic diseases. Results were also compared with those obtained with the 2B2t antigen in ELISA. The ROC curve analysis showed that the strips containing the 2B2t antigen produce the largest AUC, compared with those from the strips containing the native antigen and the 2B2t-ELISA. The sensitivity of the three tests was strongly influenced by the cyst stage according to the WHO-IWGE ultrasound classification, with higher number of positives for active and transitional cysts than for inactive cysts. The use of the recombinant antigen 2B2t in the immunochromatographic assay developed in collaboration with Vircell improves the overall diagnostic usefulness over that based on native antigens, showing similar sensitivity for active and transitional cysts (~95%) and higher specificity (81.1% vs. 57.8%) than strips containing native antigens.

## INTRODUCTION

Human cystic echinococcosis (CE) is caused by the larvae of the tapeworm *Echinococcus granulosus*. The diagnosis is addressed through imaging and immunodiagnosis is used for those patients showing an image suggestive of CE to confirm the finding. The techniques that are more frequently applied nowadays in diagnostic laboratories are the ELISA and immunoblot (IB) for the detection of specific antibodies against native (hydatid fluid, HF) antigens (Moro and Schantz, 2009, Feng *et al.*, 2010). Nevertheless, HF give rise to false positive and negative results (Eckert and Deplazes, 2004; Carmena *et al.*, 2006). Additionally, the ELISA and IB are complex techniques requiring equipment, expensive reagents and trained personnel. This precludes its use in many areas where CE is endemic but resources are limited. Lack of resources for the diagnosis of patients in developing countries raises the need for easy to use diagnostic methods and with a low cost of production, transport and handling.

The technology called lateral flow immunochromatographic assay (LFIA), better known as immunochromatography, has been applied to numerous tests for the detection of pathogens, drugs, hormones and metabolites, encompassing many different fields (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009). These tests consist of a prefabricated strip containing the dry reagents to be activated by applying the fluid sample. The use of gold or colored latex particles to attach the molecule of interest (e.g., antibodies) by biospecific interactions, results in the development of a colored line in the strip when the molecule interacts with a second reactive (e.g., a specific antigen) in the strip line. The results can be obtained between 10 and 20 minutes (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009). The Vircell company has adapted this technology to the diagnosis of CE. The test VIRapid® HYDATIDOSIS detects total specific antibodies against a fraction of HF enriched in antigens 5 and B. The company claim a test sensitivity of 94.7% and a specificity of 99.5%, although the company warn about the potential cross-reactions of this strip with patients infected with other helminths (especially cysticercosis) and patients in cancer processes.

Additional to cross-reactivity problems, the use of native antigens in commercial kits limits their utility also due to the difficulty in standardizing the use of

native antigens that are of limited availability. These limitations could be overcome through the application of recombinant antigens in these kits.

Here, we apply a new recombinant antigen built by cloning tandem of two units of antigen B2t described in a previous work (Hernández-González *et al.*, 2008) to an immunochromatography technique in collaboration with the company Vircell. This new test was subsequently compared with the immunochromatographic strips of Vircell in which purified native antigens are used, defining for each test the sensitivity with a panel of well characterized sera from CE patients and the specificity with sera from patients with parasitic diseases related with CE. The strips were both compared with the ELISA-2B2t.



## **MATERIALS AND METHODS**

### *Strips containing the 2B2t recombinant antigen.*

The methodological details about the development of these strips are subject to a confidentiality agreement, thus detailed protocols and materials, which are not needed for the full understanding of the experiments, are not provided here. Several combinations of native and recombinant antigens were done. The best strip including the 2B2t antigen combines the purified native antigen (fraction 5 and B from the HF) and a polyclonal anti-human IgG4, both conjugated to gold particles, and the 2B2t antigen in the strip line (Figure 1).

Both Vircell immunochromatographic strips were tested following the instructions given by the commercial supplier, as follows. 30 µl of serum were dosed on the well and left there not longer than 5 minutes. Then, 2 drops of developer solution were added to the well and the results were read after 30 minutes.

The line intensity is interpreted with an intensity pattern supplied with the kit, on a scale ranging from 0 to 3 (Figure 1). For an intensity value lower than 0.5, the test is considered negative.

### *Panel of sera*

The new strip developed with the recombinant antigen was compared with the original Vircell strip, hereinafter called Vircell native strip, with a panel of 475 sera (Table 1). Of these, 385 were from CE patients of Italy and Germany with different clinical characteristics, 50 patients with alveolar hydatid disease (of which 8 were selected because they displayed a positive ELISA-2B2t), four pools of sera from patients with neurocysticercosis (two pools were negative, one high positive and one medium positive in the ELISA-2B2t), and 36 sera from donors (including one positive to the ELISA-2B2t). The specificity and sensitivity were calculated for both strips and compared to the ELISA-2B2t.

### *ELISA-2B2t*

An ELISA for the detection of IgG antibodies against the recombinant antigen 2B2t was performed as follows. Ninety-six-well polystyrene plates (Corning, Spain) were incubated at 4°C overnight with 100 µl/well 2B2t (0.5µg/ml) in carbonate buffer (pH 9.6). Plates then were washed six times with phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) and 0.05% Tween 20 (washing buffer) and incubated for 1.5 h at 37°C with 200 µl washing buffer plus 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma Aldrich, Spain) (blocking buffer). Sera then were added in duplicate (100 µl/well) at 1:200 dilutions in blocking buffer, and the plates were incubated for 1 h at 37°C. After the plates were washed as described above, the secondary antibody (peroxidase-labeled rabbit anti-human IgG; Sigma Aldrich) was added (100 µl/well) at a 1:2,000 dilution in blocking buffer, and the plates were incubated for 1 h at 37°C. After the plates were washed as described above, the reaction was developed in the dark with 100 µl/well of citrate buffer, pH 5, plus orthophenylene diamine (0.28 mg/ml; Sigma Aldrich) and hydrogen peroxide (0.4 µl/ml; Sigma Aldrich). The reaction was stopped with 50 µl/well of 3 N sulfuric acid (Panreac), and plates were read at 492 nm in an ELISA reader (EAR 400 FT; SLT Lab Instruments, Germany). (Hernández-González *et al.*, 2012)

The serological index (SI) was calculated for each optical density by using the following formula:  $[(NC - S)/(NC - PC)] * 100$ , where NC and PC represent the negative and positive controls, respectively, and S stands for each serum.

The best cutoff value was previously determined by ROC curves (not shown), using the SI values of 186 sera from patients with CE as true positives and 110 sera from healthy donors and 174 sera from patients with other pathologies (alveolar hydatid disease, cysticercosis, taeniosis and hepatitis) as true negatives (Hernández-González *et al.*, 2012). For this calculation, we used SPSS version 19.0. The cutoff value for the immunochromatographic strips was established by the commercial supplier at 0.5 (Figure 1C).

#### *Comparison of the three diagnostic tests*

To compare the diagnostic accuracy of each test, the values of the area under the ROC curve (AUC) were calculated. The ROC curves were constructed by plotting

the sensitivity and 1-specificity for each of the intensity values of the test line with each serum obtained in the case of the immunochromatographic strips and, in the case of ELISA-2B2t, for each of the values of SI. For the construction of the ROC curves sera from patients with CE were considered true-positive, and sera from healthy donors and patients with other diseases were considered true negative.

After determining the sensitivity, specificity and diagnostic efficiency of each the tests, a chi-square test was used to compare the sensitivity in groups of CE patients with different clinical and cyst-related characteristics, which could influence the resulting sensitivity. A *P* value, 0.05 was considered statistically significant. Additionally, two different statistical approaches were used to evaluate the influence of the different clinical variables on the diagnostic performance of the different tests. First, a bivariate binary logistic regression was performed to calculate the odd ratio (OR) for each pair of clinical variables, and identify those associated with test performance. Then, the significant variables were further analysed by multivariate binary logistic regression, to identify those independently associated with the performance of each serological test, taking into account the simultaneous participation of the other variables (Hernández-González *et al.*, 2012). All statistical analyses were performed with SPSS v.19 (www.ibm.com).

## RESULTS

### *Sensitivity and specificity*

The strips developed with native antigens were shown to be slightly more sensitive than those containing the recombinant antigen. However, the use of the recombinant antigen in the strip resulted in a best specificity and less frequent cross-reactions than the use of the native antigens (Table 2). The main cross-reactivity for both strip types were detected with alveolar echinococcosis (AE) patients, followed by those with neurocysticercosis (NCC), although it should be noted that the number of sera from patients with NCC was very limited (Table 2). Additionally, native strips gave rise to equivocal results (defined as a detectable reaction but below 0.5) with 17 sera from healthy donors and patients with other parasitic diseases, while only 8 of those sera gave rise to similar reactions in the strips containing the recombinant antigen (data not shown).

The ELISA with antigen 2B2t showed a higher specificity than the two strips, but the sensitivity was much lower (57.1%) than the sensitivity obtained with the two types of strips (Table 2).

With these same sera, ROC curves were constructed for each of these tests, by representing SI values in the case of ELISA and for the two strips the values of band intensity between 0 and 3 are represented (Figure 3A). These curves show that the strips carrying the recombinant antigen 2B2t give rise to the highest AUC value (Figure 3B), although the differences with the AUC of the strips containing the native antigen were not statistically significant (Figure 3C).

### *Influence of the clinical characteristics of patients in the sensitivity of the serological tests*

By using contingency tables and chi-square test, the sensitivity obtained with each test for each patient's clinical features was calculated and compared (Table 3). The sensitivities for both type of strips were significantly different ( $P < 0.05$ ) for all variables except for the affected organ. For the ELISA-2B2t are all significantly different.

The sensitivity values for both strips are very comparable for patients with hepatic cysts, with active cysts or for sera collected after treatment. For the other variables, the sensitivity values are slightly higher for the strips with native antigens. The differences in sensitivity displayed within each variable for the ELISA-2B2t are generally higher than with the strips.

To show which variables were most influential in the outcome of each test, a multivariate logistic regression analysis was performed (Table 3). The results indicate that the native antigen strips are only influenced by the cystic stage, being more likely that the test results positive with active cysts. The recombinant antigen strips are affected by all variables studied here, except the cyst location, being the most influential factor in the outcome of this strip type the cyst stage. The ELISA-2B2t sensitivity is influenced by the number of cysts and cystic stage, the latter being the most potent influencing factor again.

We performed a more detailed comparison of the sensitivity values for each test according to the cyst image classification (Figure 4). Slight differences in the number of positive patients were found between the two types of strips for CE1, CE2 and CE3 cysts. The highest differences were found in CE4 and CE5 cysts. Higher differences in sensitivity were found between both strips and the ELISA-2B2t for every cyst type (Figure 4).

## DISCUSSION

The use of native antigens presents a number of disadvantages with respect to the use of recombinant antigens for the development of diagnostic tests and its use for the detection of specific antibodies in CE patients, e.g., lower specificity and difficulties in standardizing its obtainment, among others (Eckert and Deplazes, 2004; Carmena *et al.*, 2006; Tawfeek *et al.*, 2011). We have developed a recombinant antigen that overcomes those problems, constituting a standardized, easy to obtain reactive and showing better diagnostic performance than the hydatid fluid in ELISA (Hernández-González *et al.*, 2012). This new recombinant antigen, called 2B2t, represents the the subunit B2 of the B antigen of *E. granulosus*. This antigen has shown a good diagnostic potential, since it is one of the most abundant and immunogenic molecules in the hydatid fluid.

The use of te 2B2t antigen resulted in a better diagnostic performance than the obtained with the HF, but the technique used for this validation, the ELISA, is relatively complex, expensive and time-consuming. Several private biotech companies have developed kits for the diagnosis of CE based in different techniques, most frequently ELISA and haemmagglutination. Alternative and cheap tools, e.g. based in the immunochromatography, have been approached by several authors (Sbihi *et al.*, 2003), but have only occasionally reached the market.

The biotech company Vircell ([www.vircell.com](http://www.vircell.com)) has developed a kit based in the use of the immunochromatography for the diagnosis of CE in humans. The VIRapid HYDATIDOSIS test is a strip containing native antigens consisting on a purified fraction of HF enriched in antigens B and 5 ([http://www.vircell.com/fileadmin/Material\\_Promocional/Flyers/Flyer\\_VIRapid\\_HYD\\_ES\\_07.04.2010.pdf](http://www.vircell.com/fileadmin/Material_Promocional/Flyers/Flyer_VIRapid_HYD_ES_07.04.2010.pdf)). Since our recombinant antigen 2B2t could represent an alternative to the use of native antigens in this kit, we have developed in collaboration with Vircell a kit based in the substitution of the native antigens by the 2B2t protein in the VIRapid HYDATIDOSIS test. That new tool was compared with the original kit and with the use of the 2B2t antigen in ELISA.

The overall sensitivity of the strips containing the native antigens was slightly higher than of the strips displaying the recombinant protein. More specifically, the

sensitivity for patients with active and transitional cysts was similar for both strips (around 95%), being the differences in overall sensitivity attributable to a higher number of 2B2t-negative patients in the group of inactive cysts. The higher percentage of positive results with inactive cysts against the native antigen could be attributed to the phenomenon of persistence of antibodies to HF antigens in cured patients (in this case with inactive cysts), which remain in circulation long after the discontinuation of the antigenic stimulus (e.g. Zarzosa *et al.*, 1999; Bulut *et al.*, 2001; Doiz *et al.*, 2002). The comparable sensitivity of both strips with active and transitional cysts, and the lower number of positives for inactive lesions against the 2B2t, point out a better performance of the new strip compared with the original one, regarding sensitivity for the detection of live parasite lesions, and also due to its potential to complement the imaging diagnosis regarding the definition of cyst activity.

As for the influence of other clinical variables besides cyst classification on the sensitivity of the strips containing the 2B2t protein, we have shown that all of them influenced its performance. Since some of those variables could account for a false negative result, clinical variables should be evaluated together with the test result to reach a reliable conclusion. However, and despite this influence, the 2B2t strips were more sensitive than the ELISA with the same antigen. This was not expected, since the ELISA technique is usually related with higher diagnostic sensitivity than immunochromatographic strips, mainly due to technical variables, e.g., prolonged periods of sample incubation that could facilitate the binding of a higher number of antibody molecules to the antigen, and others. Additionally, some other variables could account for this unexpected results, since the 2B2t antigen in the strip binds all antibody isotypes, while the detection of antibodies in the respective ELISA was limited by the specificity (total IgG) of the secondary antibody.

Since sensitivities of both strips were comparable, one of the strengths of the new developed strip was its higher specificity when compared with the original strip. Several recombinant proteins have shown to display less cross-reactivity than the HF (e.g., Virginio *et al.*, 2003; Sbihi *et al.*, 2003). This is specially important in areas where *E. multilocularis* co-exists with *E. granulosus*, in which diagnostic approaches applied to date could lead to misinterpretations (Brunetti *et al.*, 2010).

In conclusion, we have shown that the use of the recombinant antigen 2B2t in immunochromatographic strips results in a better diagnostic performance compared with the same technical approach using native antigens. Since the production of the 2B2t recombinant antigen has already been protocolized and standardized (Hernandez-Gonzalez *et al.*, 2012), and its application has been done in a ready to commercialize kit, the 2B2t strips could constitute one of the best alternatives for the accurate diagnosis of CE in clinical settings.



## REFERENCES

- Brunetti E, Kern P, Vuitton DA; Writing Panel for the WHO-IWGE. (2010). Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Tropica* 114, 1-16. Review.
- Bulut V, Ilhan F, Yucel AY, Onal S, Ilhan Y, Godekmerdan A. (2001). Immunological follow-up of hydatid cyst cases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96, 669-671.
- Carmena D, Benito A, Eraso E. (2006). *Antigens for the immunodiagnosis of Echinococcus granulosus* infection: An update. *Acta Tropica* 98, 74-86. Review.
- Doiz O, Benito R, Gil J, Rojas A, Rubio MC, Osuna A. (2002). Pre- and postsurgical detection of IgG, IgM, and IgA specific to hydatidosis by ELISA with purified antigen enriched with the 5/B antigen complex. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 16, 295-298.
- Eckert J, Deplazes P. (2004). Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clinical Microbiology Reviews* 17,107-135. Review.
- Feng X, Wen H, Zhang Z, Chen X, Ma X, Zhang J, Qi X, Bradshaw H, Vuitton D, Craig PS. (2010). Dot immunogold filtration assay (DIGFA) with multiple native antigens for rapid serodiagnosis of human cystic and alveolar echinococcosis. *Acta Tropica* 113, 114-120.
- Hernández-González A, Muro A, Barrera I, Ramos G, Orduña A, Siles-Lucas M. (2008). Usefulness of four different *Echinococcus granulosus* recombinant antigens for serodiagnosis of unilocular hydatid disease (UHD) and postsurgical follow-up of patients treated for UHD. *Clinical and Vaccine Immunology* 15, 147-153.

Hernández-González, Santivañez S, García HH, Rodríguez S, Muñoz S, Ramos G, Orduña A, Siles-Lucas M. (2012). Improved serodiagnosis of cystic echinococcosis using the new recombinant 2B2t antigen. *PloS Neglected Tropical Diseases* 6, e1714

Moro P, Schantz PM. (2009). Echinococcosis: a review. *International Journal of Infectious Diseases* 13, 125-133. Review.

Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. (2009). Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393, 569-582.

Sbihi Y, Gil JR, Alvarez PA, Orduña A, Rodríguez-Torres A, Osuna A. (2003). Development of a dipstick dye immunoassay for diagnosing hydatidosis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 17, 219-222.

Tawfeek GM, Elwakil HS, El-Hoseiny L, Thabet HS, Sarhan RM, Awad NS, Anwar WA. (2011). Comparative analysis of the diagnostic performance of crude sheep hydatid cyst fluid, purified antigen B and its subunit (12 Kda), assessed by ELISA, in the diagnosis of human cystic echinococcosis. *Parasitology Research* 108, 371-376.

Virginio VG, Hernández A, Rott MB, Monteiro KM, Zandonai AF, Nieto A, Zaha A, Ferreira HB. (2003). A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clinical and Experimental Immunology* 132, 309-315.

Zarzosa MP, Orduña Domingo A, Gutiérrez P, Alonso P, Cuervo M, Prado A, Bratos MA, García-Yuste M, Ramos G, Rodríguez Torres A. (1999). Evaluation of six serological tests in diagnosis and postoperative control of pulmonary hydatid disease patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 35, 255-262.

## LEGENDS FOR FIGURES

Figure 1. A. Schematic representation of an immunochromatographic strip. The figure shows molecules used for the VIRapid HYDATIDOSIS strips and the newly developed (2B2t-) strips. B. Rapid diagnostic tests developed in Vircell for the diagnosis of hydatid disease. R, strip carrying the recombinant antigen 2B2t; N, strip with native antigens (VIRapid HYDATIDOSIS). + indicates a positive test result and - indicates a negative test result. Test indicates the line that shows a positive test result, and Control shows the control line test. Sample shows the place where the diluted sample is applied. C. Intensity pattern of the test line for the interpretation of the immunochromatographic result. 0 and S (-) indicate a negative result; 0.5 and S (+) LOW, indicates a weakly positive result; 1 and 2 indicate a positive result, and 3 and S (+) HIGH indicate a strong positive result.

Figure 2. Overall sensitivity and specificity obtained with each of the tests. Sensitivity values (SE) were obtained with the 385 sera from patients with CE. The specificity (SP) corresponds to the false negatives detected both in healthy donors and patients with other diseases.

Figure 3. Comparison of the diagnostic efficiency of the immunochromatographic strips transporting the native antigens or the 2B2t recombinant antigen, and the ELISA 2B2t by ROC analysis. A. ROC curve for each of the evaluated tests. B. Area under the ROC curve (AUC) of each test, indicating the standard error, significance and confidence interval (95%) for each AUC. C. Statistical significance of the differences between AUCs for each of the tests, compared in pairs.

Figura 4 Comparison of the sensitivity of the VIRapid HYDATIDOSIS strips, 2B2t strips and the ELISA-2B2t for each cystic stage. A. Representation of the percentages of positivity for each stage cystic. B. N, number of sera from each cystic stages, +, the number of positive sera in each stage for each test, %, the percentage of positive sera for each strip and the ELISA-2B2t.

# FIGURES

FIGURE 1

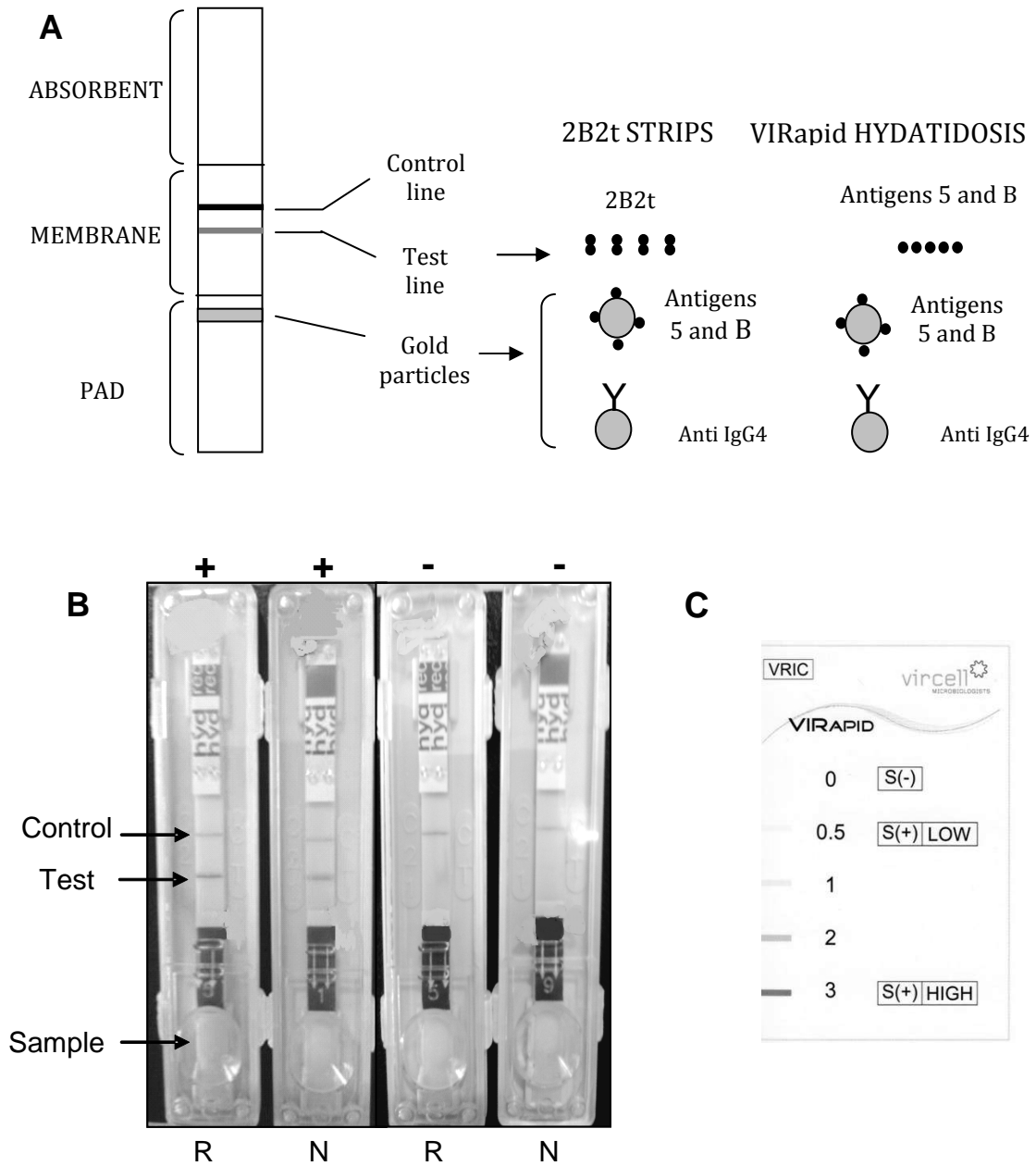


FIGURE 2

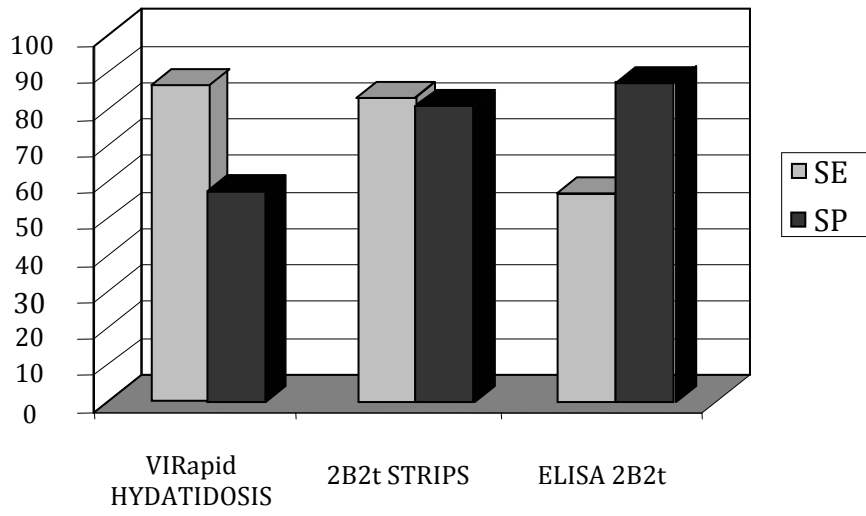
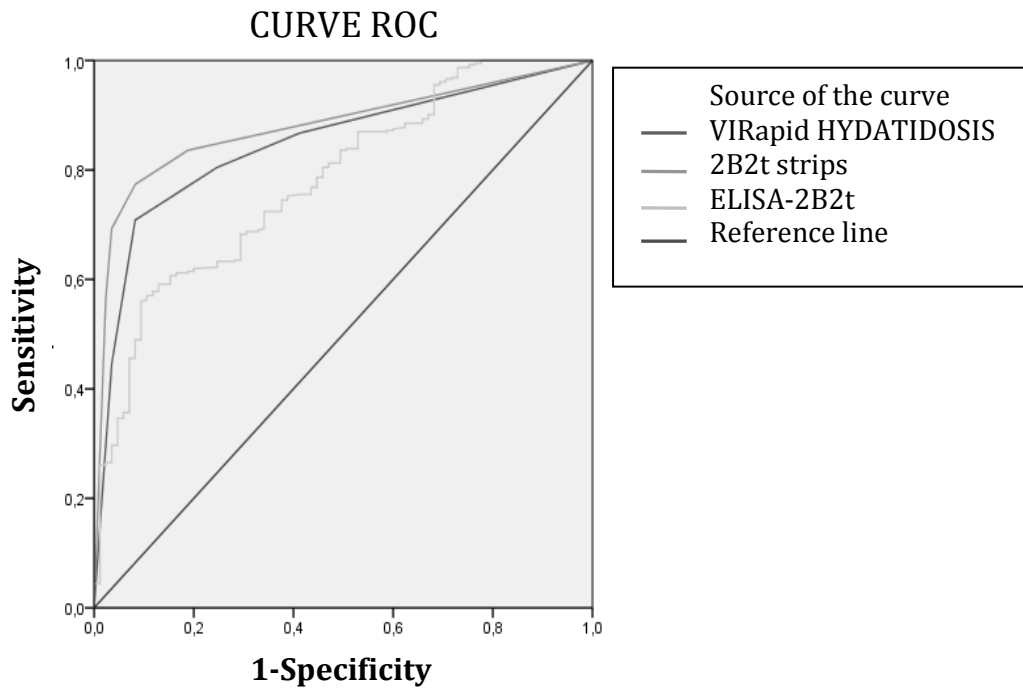


FIGURE 3



A

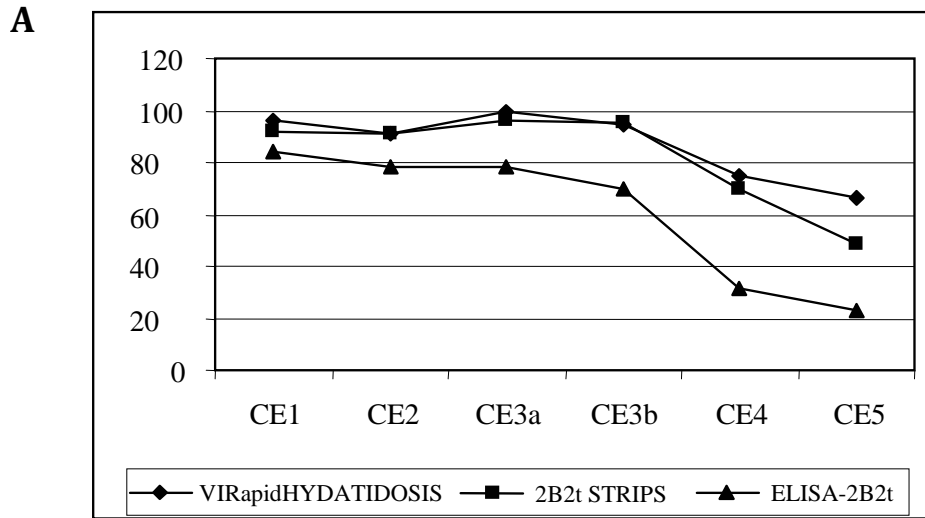
B

AREA UNDER THE CURVE (AUC)				
Contrast outcome variables	Area	Standard error	Asymptotic sig.	Confidence interval
VIRapid HYDATIDOSIS	0.846	0.021	0.000	0.8-0.89
2B2t-STRIPS	0.879	0.018	0.000	0.84-0.91
ELISA-2B2t	0.780	0.026	0.000	0.73-0.83

C

UNIFORMITY TEST AREA				
	VIRCELL RECOMBINANT		ELISA-2B2t	
	Ji-square	P value	Ji-square	P value
VIRapid HYDATIDOSIS	0.6518	0.419	17.3281	0.000
2B2t STRIPS			27.316	0.000

FIGURE 4



**B**

		<b>CE1</b>	<b>CE2</b>	<b>CE3a</b>	<b>CE3b</b>	<b>CE4</b>	<b>CE5</b>
	<b>N</b>	25	23	51	140	107	39
<b>VIRapid HYDATIDOSIS</b>	+	24	21	51	132	80	26
	%	96.0	91.3	100.0	94.3	74.8	66.7
<b>2B2t STRIPS</b>	+	23	21	49	134	75	19
	%	92.0	91.3	96.1	95.7	70.1	48.7
<b>ELISA-2B2t</b>	+	21	18	40	98	34	9
	%	84.0	78.3	78.4	70.0	31.8	23.1

## TABLES

Table 1. Sera panel used for the comparison of the diagnostic performance of the three tests under study (VIRapid HYDATIDOSIS, 2B2t strips and ELISA-2B2t).

<b>CE PATIENTS</b>			<b>OTHER SERA</b>		
	<b>N</b>	<b>%</b>		<b>N</b>	<b>%</b>
<b>WHO IWGE classification</b>			Healthy donors	36	40.0
CE1	25	6.5	Alveolar echinococcosis	50	55.5
CE2	23	6.0	Neurocysticercosis	4	4.4
CE3a	51	13.2			
CE3b	140	36.4			
CE4	107	27.9			
CE5	39	10.2			
<b>Cyst location</b>					
Liver	365	94.8			
Others	20	5.2			
<b>Cysts number</b>					
Single	233	60.5			
Múltiple	152	39.5			
<b>Serum collection</b>					
Before treatment	225	58.4			
After treatment	160	41.5			

N, number of sera; %, percentage.



Table 2. Comparison of the sensitivity and specificity of the VIRapid HYDATIDOSIS strips, the 2B2t strips and the ELISA-2B2t in the diagnosis of CE.

	VIRapid HYDATIDOSIS	2B2t strips	ELISA-2B2t
<b>Confirmed cases, n=385 (Sensitivity)</b>	334 (86.8%)	321 (83.4%)	220 (57.1%)
<b>Donors, n=36 (Specificity)</b>	2 (94.4%)	0 (100%)	1 (97.2%)
<b>Cross reactions, n=54</b>			
Alveolar echinococcosis, n=50	33 (66%)	16 (32%)	8 (16%)
Neurocysticercosis, n=4	3 (75%)	1 (25%)	2 (50%)

The results are shown as number of positive sera against the different diagnostic tools. The sensitivity, specificity and corresponding cross-reactions are shown in parentheses as percentages. n, number.

**Table 3.** Influence of defined clinical variables on the results of three different diagnostic tools (chi<sup>2</sup> and logistic regression).

	VIRapid HYDATIDOSIS			2B2t STRIPSt			ELISA-2B2t		
	SE% (+)	P	M-OR (CI)	SE% (+)	P	M-OR (CI)	SE% (+)	P	M-OR (CI)
NUMBER OF CYSTS	Single (233)		1	79% (184)		1	48,1% (112)		1
	Múltiple (152)	<b>0,037</b>	1,8 (0,89-3,6)	89,5% (136)	<b>0,006</b>	<b>2,1 (1,1-4,1)</b>	71% (108)	<b>0,000</b>	<b>2,8 (1,7-4,5)</b>
LOCATION	Liver (365)		1	82,7% (302)		1	55,6% (203)		1
	Other (20)	0,229	1,3 (0,16-11,4)	95% (19)	0,22	1,6 (0,2-14,5)	85% (17)	<b>0,010</b>	2,4 (0,6-9,6)
WHO CLASSIFICATION	CE4+5 (146)		1	64,4% (94)		1	74,1% (177)		1
	CE1+2+3 (239)	<b>0,000</b>	<b>6,5 (3,1-13,6)</b>	95% (227)	<b>0,000</b>	<b>8,4 (4,2-16,8)</b>	29,5% (43)	<b>0,000</b>	<b>6,4 (3,9-10,4)</b>
COLLECTION OF SERUM	Before treat. (225)		1	76,4% (172)		1	49,3% (111)		1
	Alter treat. (160)	<b>0,002</b>	1,7 (0,8-3,6)	95% (227)	<b>0,000</b>	<b>2,5 (1,2-5,1)</b>	68,6% (109)	<b>0,000</b>	1,4 (0,9-2,3)

SE% (+), sensitivity and positive number. The association and influence of the clinical variables enumerated in the first column on the sensitivity of the VIRapid HYDATIDOSIS, VIRCELL-2B2t strips and 2B2t-ELISA was statistically assessed. M-OR: odds ratio in the multivariate regression analysis. CI: 95% confidence interval. Statistically significant differences (P≤0.050) are shown in the table (in bold). treat.: treatment.

## **Serological follow-up of human cystic echinococcosis by the recombinant antigen 2B2t**

A Hernandez-Gonzalez 1, E Brunetti 2, F Tamarozzi 3, V Meroni 2, F Genco 2, T Junghanss 4, M Stojkovic 4, JM Delgado 5, FM Soriano 5, M Siles-Lucas 1

1Parasitology Group, IRNASA, National Research Council, 37008 Salamanca, Spain.  
2Department of Infectious Diseases, San Matteo Hospital Foundation, WHO Collaborating Centre for Clinical Management of Cystic Echinococcosis, University of Pavia, Pavia 27100, Italy. 3Molecular and Biochemical Parasitology Group. Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place L35QA, Liverpool, UK. 4Section of Clinical Tropical Medicine, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany. 5Vircell S.L., Pol. Ind. Dos de Octubre, Plaza Domínguez Ortiz 1, 18320 Santa Fé, Granada, Spain.

Corresponding author: M. Siles-Lucas. Parasitology Group, IRNASA, National Research Council, 37008 Salamanca, Spain. Email: mmar.siles@irnasa.csic.es

## **ABSTRACT**

The follow-up of cystic echinococcosis (CE) patients remains problematic due to the limitations of the techniques available to determine the success of the applied treatment. We study and compare the usefulness of the evaluation of the antibody response against two recombinant antigens (B2t and 2B2t) and the hydatid fluid in ELISA for the follow-up of CE patients. For CE patients in follow-up after surgery or aspiration, treatment with albendazole or under “watch and wait”, a decreased level of antibodies over time in patients with favourable outcome against the recombinant antigens was detected. The usefulness of the 2B2t recombinant antigen in a diagnostic kit based on the immunochromatography (IC) was also assessed for the follow-up of patients after surgery. The 2B2t recombinant antigen, both in ELISA and IC, showed potential for monitoring CE patients under different clinical management strategies.

## INTRODUCTION

Currently there are four main clinical management modalities that are applied in human cystic echinococcosis (CE): surgery, percutaneous drainage, drug treatment with benzimidazoles, and “watch and wait” (WHO Informal Working Group, 1996; Junghanss et al., 2008, Stojkovic et al., 2009; Brunetti et al., 2010). The use of a defined management is decided mainly based on the type of cyst following the WHO classification by ultrasound (Informal Working Group, 2003), and when indicated depending on the presence and type of complications.

Given that the risk of recurrence is relatively high in the case of surgery -up to 20% (Junghanss et al., 2008) -, and that drainage techniques and drug treatment also have a percentage of failure and regression, differentiation between patients with good progression (to inactive cysts) and cured patients from patients with recurrences, potential regressive states and not cured, is key to evaluating the success or failure of the clinical management of CE (Carmena et al., 2007; Frider and Larrieu, 2010). However, the follow-up alternatives for patients with CE remains a problem because of the limitations of available techniques.

Ultrasonography is used for the monitoring of patients, but its usefulness for the follow-up can lead to misleading conclusions, since it is not useful to detect minimal changes of the hydatid cyst membranes and degeneration of the germinal layer. Additionally, the detection of new cysts after an intervention is limited, since a minimum size of the cysts is needed to be detected by this technique (Rigano et al., 2002; Rogan et al., 2006; Ben Nour et al., 2009; Tamarozzi et al., 2010; Frider and Larrieu, 2010).

Immunodiagnostic techniques could represent a good approach to aid in the follow-up of CE patients. Several serological tests -the indirect hemagglutination, ELISA and immunoblotting- have been used to follow up CE patients after surgery or after drug treatment (Force et al., 1992; Ravinder et al., 1997; Zarzosa et al., 1999; Gadea et al., 2000; Bulut et al., 2001; Doiz et al., 2001; Rigano et al., 2002). Nevertheless, these have been based in the detection of antibodies against crude antigens, and thus have the disadvantage that specific antibodies may persist in the serum of patients several years after recovery (eg Force et al., 1992; Zarzosa et al.,

1999; Ben Nour et al., 2008; Hernández-González et al., 2008). Therefore, it is necessary to evaluate new markers useful for monitoring patients undergoing each of the different treatment options that could allow the differentiation of patients cured and non cured after a defined clinical management.

Some authors have shown that specific antigenic bands of the hydatid fluid (HF) disappear faster than others when faced with sera from patients monitored by the IB technique (Doiz et al., 2001 for the bands of 39 and 42 kDa; Gadea et al., 2000 for the 145 kDa, and Celik et al., 2009, for bands of 29 and 205 kDa). Thus, purified native 5 and B antigens have also been tested for monitoring. The percentage of positive patients against those purified antigens decreases faster than against crude antigens after cure (Doiz et al., 2002, Nasrieh and Abdel-Hafez. 2004; Ben Nour et al., 2008; Celik et al., 2009).

In a previous work, our group described the recombinant antigen B2t, that showed usefulness for the definition of cure in CE patients after surgery, compared to HF in ELISA (Hernández-González et al., 2008), The B2t antigen was the basis for the obtainment of its tandem-repeated version called 2B2t, that showed diagnostic advantages in comparison with the original B2t antigen (Hernández-González et al., 2012).

In this work we investigate the usefulness of this new antigen, compared with the B2t and HF in ELISA, for monitoring patients after surgery or aspiration, after drug treatment and in a “watch and wait” regime. Furthermore, we also test the utility of the 2B2t antigen when applied in an immunochromatographic (IC) test, compared with the ELISA-2B2t and the commercial kit VIRapid ® HYDATIDOSIS, this last also based in IC but containing native antigens.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Antigens*

Crude sheep HF collected from fertile hydatid cysts and containing viable protoscoleces was kindly provided by S. Jiménez (Servicio de Seguridad Alimentaria y Sanidad Ambiental, Consejería de Salud de La Rioja, Spain). The HF was centrifuged at 1,000 g for 5 min, and the protein concentration in the supernatant was measured with the Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce). The supernatant was then stored at -80 °C until use.

Recombinant antigens: The expression vectors pGEX-4T2 and pGEX-4T1 containing the relevant nucleotide sequences of the antigens B2t and 2B2t were used to transform BL21 CodonPlus RIL competent cells, derivative of *Escherichia coli* (Stratagene). Induction, expression and purification of both proteins was done as described in Hernández-González et al. 2008 and 2012.

### *ELISA*

ELISA for detecting antibodies in sera IgG production against the antigen recombinant B2t and 2B2t was performed as follows. Ninety-six-well polystyrene plates (Corning, Spain) were incubated at 4°C overnight with 100 µl/well B2t or 2B2t (0.5µg/ml) in carbonate buffer (pH 9.6). Plates then were washed six times with phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) and 0.05% Tween 20(washing buffer) and incubated for 1.5 h at 37°C with 200 µl washing buffer plus 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma Aldrich, Spain) (blocking buffer). Sera then were added in duplicate (100 µl/well) at 1:200 dilutions in blocking buffer, and the plates were incubated for 1 h at 37°C. After the plates were washed as described above, the secondary antibody (peroxidase-labeled rabbit anti-human IgG; Sigma Aldrich) was added (100 µl/well) at a 1:2,000 dilution in blocking buffer, and the plates were incubated for 1 h at 37°C. After the plates were washed as described above, the reaction was developed in the dark with 100 µl/well of citrate buffer, pH 5, plus orthophenylene diamine (0.28 mg/ml; Sigma Aldrich) and hydrogen peroxide (0.4 µl/ml; Sigma Aldrich). The

reaction was stopped with 50 µl/well of 3 N sulfuric acid (Panreac), and plates were read at 492 nm in an ELISA reader (EAR 400 FT; SLT Lab Instruments, Germany).

The serological index (SI) was calculated for each optical density by using the following formula:  $[(NC - S)/(NC - PC)] * 100$ , where NC and PC represent the negative and positive controls, respectively, and S stands for each serum.

The best cut off value was previously determined by ROC curves (not shown), using the SI values of 186 sera from patients with CE as true positives and 110 sera from healthy donors and 174 sera from patients with other pathologies (alveolar hydatid disease, cysticercosis, taeniosis and hepatitis) as true negatives (Hernández-González *et al.*, 2012). For this calculation, we used SPSS version 19.0.

#### *Development of the immunochromatographic strips containing the 2B2t antigen*

The immunochromatographic strips for the diagnosis of hydatid 2B2t carrying the recombinant antigen and native antigens were developed in the company Vircell SL (Granada, Spain). Both Vircell immunochromatographic strips were tested following the instructions given by the commercial supplier, as follows. 30 µl of serum were dosed on the well and left there not longer than 5 minutes. Then, 2 drops of developer solution were added to the well and the results were read after 30 minutes.

The line intensity is interpreted with an intensity pattern supplied with the kit, on a scale ranging from 0 to 3 (Figure 1). For an intensity value lower than 0.5, the test is considered negative.



### *Patients and sera*

634 sera from 231 CE patients from Italy, Germany and Spain retrospectively collected were used. Table 1 shows the clinical characteristics of the corresponding patients. All patients were followed by an image technique throughout the whole monitoring period.

The 231 patients were divided according to their clinical management in three groups: (i) subjected to surgical treatment or an aspiration technique, (ii) subjected only to drug treatment, and (iii) under "watch and wait". In all cases, our objective was to determine the agreement between the presence and/or status of the cyst (active, transitional or inactive), assessed by imaging techniques (gold standard) and the level of specific antibodies -between patient outcome and serology results-, for each test.

### *Monitoring of patients following surgery or an aspiration technique*

Patients who had undergone surgery (n = 57) or an aspiration technique (n = 14) were divided into "cured patients" considered as those showing the absence of the cyst removed by surgery or a residual cavity after aspiration, and showing no recurrences or images suggesting parasitic activity during the follow-up period. The second group were "non cured patients", including in this category patients who showed secondary CE or images suggestive of parasitic activity in the corresponding residual cavity during the monitoring period. All patients included in this group had at least two sera, the first of them positive for all antigens in ELISA and collected before or shortly after surgery.

For these two groups, the levels of antibodies and the percentage of positivity were evaluated for each antigen during the whole follow-up period. The Kruskal-Wallis test was used to check for differences between time intervals within each group, considering significant values  $P < 0.05$ . This test will indicate whether there were significant differences in the variations of SI (specific antibody levels) within each of these two groups during the follow-up time.

The immunochromatographic strips were also assessed for their utility in monitoring patients after surgery or aspiration. Due to limitations in the available volume of serum from the different groups, we could only assess this in 19 cured and 10 non-cured patients (Table 2). The results were compared with those obtained with the ELISA-2B2t and the VIRapid HYDATIDOSIS strips (Vircell SL)

#### *Monitoring of patients after treatment with albendazole*

In patients treated only with albendazole, the cystic classification before treatment and during the follow-up period was assessed by an image technique. This group was divided into subjects with good outcome when the image evolved to inactive states (CE4 and CE5, 7 patients, 30 sera) and with bad outcome when the cyst kept active (37 patients, 148 sera). These two groups were compared regarding SIs and the percentage of positive sera for each of the antigens tested over time after treatment, starting from the end of the last cycle treatment, and classifying the sera before that time point as time 0. The first serum collected from each patient had a positive value in ELISA for all antigens.

The statistical test applied to determine significant differences in the SI between the different time intervals was the Kruskal-Wallis test.

#### *Monitoring of “watch and wait” patients.*

For patients in “watch and wait”, sera were classified according to the type of cyst, assessed by an image technique. This group included 116 patients and 236 sera. Most of these patients had an inactive image (CE4 and CE5) at the beginning of the follow-up. Only two patients evolved from active to an inactive lesion during the monitoring period. The values of SI and the percentage of positivity were compared for each cyst type subgroups. SI values were represented in box-plot diagrams and subjected to the Kruskal-Wallis test to determine significant differences between these subgroups. In addition a comparison of the percentages of positive sera for each cyst stage with each of the tested antigens was done.

This percentage and the SI trend with respect to cyst activity was compared with 264 sera of patients who had undergone drug treatment, and that were collected only until the second year after the end of the last drug treatment cycle.

All statistical calculations were done using SPSS version 19.0.

## RESULTS

### *Follow-up after surgery or or an aspiration technique*

SI results of sera from each group of patients for each antigen in ELISA are shown in Figure 2, in which this index is represented after subtracting the corresponding cut off (50), so that sera with values  $\geq 0$  are considered positive and sera with values  $<0$  are negative. The line indicating the trend of the values of SI along the monitoring period is also represented .

Since SI values were not normally distributed, comparisons between groups were done with the nonparametric Kruskal-Wallis test. The Kruskal-Wallis test for independent samples determined that there were no significant differences between time intervals in the group of non cured patients for all antigens. In cured patients, SI values were statistically different among the different time intervals for all the tested antigens ( $P < 0.05$ ).

To check the evolution of the level of specific antibodies in each test for cured and non-cured patients, the number of positive sera in each time point after intervention was assessed to calculate the percentage of positivity (Figure 3).

The SI trend for cured patients against HF is decreasing, although only 25% of sera resulted negative at the end of the follow-up. In the group of non cured patients, all sera remained positive until the end of the follow-up, similar than for the reactivity showed against the recombinant antigens.

Cured patients showed a accentuated decrease in the trend of the SI along the follow-up period against both recombinant antigens, and a high percentage of patients resulted negative at the end of the follow-up period, more evident for the B2t antigen when compared with the 2B2t antigen (Figure 3).

### *Follow-up after drug treatment*

The results of the SI-50 against the tested antigens from sera of patients after drug treatment and corresponding percentage of positive sera are shown in Figure 4 and 5, respectively.

Since the SI values were not normally distributed, the nonparametric Kruskal-Wallis test for independent samples was used to find differences between time points for each patient group. This determined that the differences in the distribution of SI values within the group of patients with bad outcome were not statistically significant for HF-ELISA, while the differences were statistically different for the B2t- and 2B2t-ELISAs ( $P = 0.05$  and  $0.031$ , respectively; Figure 4).

Regarding percentage of positive sera, "cured" and "non-cured" patients showed the same results against HF, while the reactivity against the recombinant antigens showed a sharp drop in patients with good outcome after the first year of treatment, but not for patients with a bad outcome

### *Follow-up in "watch and wait" patients*

From this group of patients, only two evolved from active to inactive cysts during the monitoring period. These two patients showed negative serology against all antigens tested during the whole follow-up, and thus the evaluation of evolution through the follow-up period could not be referred to changes in the type of cyst along the time. These patients were then sub-grouped regarding their cyst classification for comparative purposes.

The SI-50 values did not follow a normal distribution (Figure 6), and the Kruskal-Wallis test show that SI were not equal across CE-subgroups for any of the antigens tested ( $P = 0.000$ ).

In general, the values of SI for patients with CE4 and CE5 cysts were lower than for the other cyst categories for all the tested antigens, although less obviously for the HF, with a high percentage of negative sera. The U Mann-Whitney test to compare the categories "active cysts" (CE1, CE2 and CE3) and "inactive cysts" (CE4 and CE5) showed differences between these two groups ( $P = 0.000$ ).

The percentage of positive and negative sera for each sub-group was calculated (Table 3A, Figure 7A), showing similar results than the SI. The 2B2t and B2t positivity showed an average of 61% and 49.1% of positive patients for active and transitional cysts, and an average of 9.5% and 10.6% for inactive cysts, respectively.

These results were compared with a group of 264 sera from patients who were treated with albendazole (Table 3B and Figure 7B). By comparing each of the subgroups (CE1 to CE5), the percentage of positive sera is much higher in drug treated patients than in “watch and wait” patients, regardless cyst classification, although differences are more accentuated for patients with active and transitional cysts than for inactive cysts.

#### *Immunochromatographic strips*

The native and recombinant antigen strips were also used to benchmark their utility in monitoring patients. Due to limited availability of sera in sufficient quantity to perform the immunoassay technique (30 µl/strip), this comparison was limited to the group of patients treated by surgery or aspiration without considering in this case patients treated pharmacologically or in “watch and wait”.

In Table 4A the results for cured patients are shown, and Table 4B shows those for non-cured patients. The 2B2t-strips, compared with the strips containing the native antigen, 9 of the patients reached negativity at the end of the follow-up, while native strips resulted in negativity for only 5 patients in the same time period, reaching negativity faster with the recombinant than with the native antigen. A tendency to negativization with the recombinant was shown to be faster and more accentuated than for the native antigen. In general, the ELISA-2B2t more patients reach negativity and negativization is faster than in any of the two strips.

## DISCUSSION

The four alternatives for clinical management of CE patients (surgery, percutaneous drainage, chemotherapy with benzimidazoles and watch and wait) require the completion of a follow-up to assess its success or failure (Carmena *et al.*, 2007; Frider and Larrieu. 2010). As mentioned, follow-up with imaging techniques show some pitfalls, since detecting minimal changes in hydatid membranes and degeneration of the germinal layer, or the detection of new small cysts is not feasible (Rigano *et al.*, 2002, Rogan *et al.*, 2006; Ben Nouir *et al.*, 2009; Tamarozzi *et al.*, 2010; Frider and Larrieu, 2010). An alternative could be the detection of antibody trends. However, antibodies against antigenic mixtures as HF remain long after cure, being bad indicators thereof.

In some cases, the presence of sub-isotypes and specific isotypes against HF or some of its purified antigens appear to be related to the activity or inactivity of cysts, and it has been postulated in some cases their usefulness as markers in monitoring, although with limitations due to the percentage of patients presenting defined isotypes / sub- isotypes (Carmena *et al.*, 2007). The detection of cytokines has been also presented as an alternative for monitoring of patients (Carmena *et al.*, 2007), although its usefulness is questioned and its routine application as well (Tamarozzi *et al.*, 2010; Piccoli *et al.*, 2012).

Advances in the characterization of alternatives using recombinant antigens have been limited so far, due to limitations in the battery of sera and clinical information of patients. The B antigen, both in recombinant form (B2t) and in its native form, showed good potential for use in detecting the decrease of specific antibodies in cured patients after surgery (Hernández-González *et al.*, 2008; Ben Nouir *et al.*, 2008). Thus, a more complete characterization of our new recombinant antigen 2B2t in their utility for monitoring patients with hydatid disease was performed here.

Since each of the clinical management options (surgery, aspiration, drug treatment and "watch and wait") is related to different evolutionary scenarios, we decided to evaluate the usefulness of 2B2t antigen in monitoring patients, compared

with B2t and HF, with a representative number of sera from patients who had undergone any of those four clinical management alternatives.

For patients undergoing surgery or aspiration, we found that antibodies against the recombinant antigens suffered a noticeable drop in cured patients, less pronounced in the case of HF. For HF, a very low percentage of cured patients reached negativity, in consonance to that mentioned by us and by others (eg, Hernández-González *et al.*, 2008; Ben Nouir *et al.*, 2008). This confirms that the HF has a very limited utility in monitoring patients after surgery, and also shows that has the same limitations for monitoring patients undergoing aspiration.

For the two recombinants, the trend in the reduction of specific antibodies in patients cured is very similar for both, although the number of negative patients at the end of the follow-up against the 2B2t was lower than for the B2t. This could be attributed to generally higher values of SI for the 2B2t compared with the B2t and thus a longer time could be needed to detect negativization against the 2B2t antigen. A similar picture is found when the immunochromatographic strips containing the 2B2t antigen were used.

Other authors have also used recombinant antigens (P29; Ben-Nouir *et al.*, 2009) for the follow-up of cured patients after surgery, although its applicability is clearly limited, since a high percentage of patients with CE (about 40%) never present antibodies against this antigen.

In the case of patients undergoing drug treatment, the results in terms of evolution of specific antibodies over time are comparable to those obtained for patients treated with surgery or aspiration and cured, since a decrease in antibody levels for patients with good outcome, more marked against recombinant antigens than against HF, was detected.

It is worth mentioning that the discontinuation of the treatment resulted in the decrease of specific antibody levels, regardless outcome. Similarly, the administration of albendazol resulted in the rise of antibody levels in those patients with active and transitional cysts at the beginning of the treatment. This was also observed for some patients showing a CE4 image. This could be related with cyst damage and exposure of antigens, than could be reverted when the treatment ceases. In this context, the



image alone would not be indicative of cure in patients treated pharmacologically, for those who progress to CE4 stages, since their potential regression to transitional cysts after the discontinuation of treatment has been shown before (eg, Stojkovic *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2011). In this sense, the positive serology against the antigen 2B2t in patients treated pharmacologically and with CE4-like images, could be indicative of parasitic activity.

Studies by several authors about the usefulness of other recombinant antigens in the monitoring of patients treated with benzimidazoles are very limited. The recombinant antigen Eg19 as described by Delunardo *et al.* (2010) was tested for monitoring patients after drug treatment, although in a very limited number of patients (five cases and 15 sera, of which two had good performance and three did not evolve). This antigen showed a very limited sensitivity (10%). The recombinant protein HSP20 was used to monitor 6 patients after chemotherapy, of whom 4 had good performance in parallel with a negative result for antibodies to this antigen in immunoblot (Vacirca *et al.*, 2011). These authors do not specify the follow-up time, and only two sera were collected for each patient. Furthermore, the use of the recombinant in immunoblot suggests that the protein is not soluble, limiting its applicability.

A slightly more comprehensive study was carried out by Li *et al.* in 2011. In this work the recombinant antigen rAgB1 is used in ELISA to monitor patients during treatment with albendazole. In patients who showed a good outcome, a progressive decline in the level of specific antibodies against this antigen was shown. However, despite this downward trend, none of the patients became negative during the monitoring period.

Because the evidence shows that a large proportion of the cysts will follow a spontaneous evolution towards calcification (Rogan *et al.*, 2006), patients with no complications or symptoms are followed by "watch and wait" (Junghanss *et al.*, 2008). In this case, the evolution will be slower than in the case of applying a treatment, so follow-up periods should be long (at least 10 years, Rogan *et al.*, 2006; Junghanss *et al.*, 2008). In our study, these times were not so long in general. This, together with the high percentage of patients showing an inactive lesion already at the initial time point, prompted us to classify this group of patients according to the cyst stage.

The trend in reactivity against the recombinant antigens in these patients, especially against 2B2t, seems to follow the "natural history" of cyst development, antigen production and antigenic exposure, with lower reactivities for CE1 cysts, a bit higher for CE2 cysts, and the highest reactivities for CE3a and CE3b cysts, going down again for inactive cysts. In connection with this, the B2 subunit expression has been shown to be reduced with the senescence of cysts (Pan *et al.*, 2011). As for comparable studies done by other authors, similar results are obtained with recombinant subunit B1, since patients with CE4 and CE5 cysts had no specific antibodies against this antigen (Li *et al.*, 2010). An opposite trend, but also indicative of cyst inactivity was observed by Margutti *et al.* (1999) for the recombinant antigen-EgEF 1 $\beta$  /  $\delta$ .

In summary, the recombinant antigen 2B2t could be useful for the follow-up of CE patients. In surgically or aspiration-treated patients, negativization against this antigen indicates cure, but not for drug-treated patients, in which the cure should be assessed with both serology and image techniques and never separately, due to potential cyst activity in some "CE4" cysts. Similarly, "watch and wait" patients can be considered cured only when the negative serology is accompanied by a CE5 image.

## REFERENCES

Ben Nour, Nuñez S, Frei E, Gorcii M, Müller N, Gianinazzi C, Mekki M, Nouri A, Babba H, Gottstein B. (2008). Post-surgical follow-up (by ELISA and immunoblotting) of cured versus non-cured cystic echinococcosis in young patients. *Parasitology* **135**, 105-114.

Ben Nour N, Gianinazzi C, Gorcii M, Müller N, Nouri A, Babba H, Gottstein B. (2009). Isolation and molecular characterization of recombinant *Echinococcus granulosus* P29 protein (recP29) and its assessment for the post-surgical serological follow-up of human cystic echinococcosis in young patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **103**, 355-364.

Brunetti E, Kern P, Vuitton DA; Writing Panel for the WHO-IWGE. (2010). Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Tropica* **114**, 1-16. Review.

Bulut V, Ilhan F, Yucel AY, Onal S, Ilhan Y, Godekmerdan A. (2001). Immunological follow-up of hydatid cyst cases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **96**, 669-671.

Carmena D, Benito A, Eraso E. (2007). Recent advances in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **25**, 263-269. Review.

Celik T, Akarsu GA, Güngör C, Colak C, Ormeci N. (2009). Evaluation of antibodies against hydatid cyst fluid antigens in the post-treatment follow-up of cystic echinococcosis patients. *Medical Science Monitor* **15**, CR170-176.

Delunardo F, Ortona E, Margutti P, Perdicchio M, Vacirca D, Teggi A, Sorice M, Siracusano A. (2010). Identification of a novel 19 kDa *Echinococcus granulosus* antigen. *Acta Tropica* **113**, 42-47.

Doiz O, Benito R, Sbihi Y, Osuna A, Clavel A, Gómez-Lus R. (2001). Western blot applied to the diagnosis and post-treatment monitoring of human hydatidosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **41**, 139-142.

Doiz O, Benito R, Gil J, Rojas A, Rubio MC, Osuna A. (2002). Pre- and postsurgical detection of IgG, IgM, and IgA specific to hydatidosis by ELISA with purified antigen enriched with the 5/B antigen complex. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **16**, 295-298.

Force L, Torres JM, Carrillo A, Buscà J. (1992). Evaluation of eight serological tests in the diagnosis of human echinococcosis and follow-up. *Clinical Infectious Diseases* **15**, 473-480.

Frider B, Larrieu E. (2010). Treatment of liver hydatidosis: how to treat an asymptomatic carrier? *World Journal of Gastroenterology* **16**, 4123-4129.

Gadea I, Ayala G, Diago MT, Cuñat A, Garcia de Lomas J. (2000). Immunological diagnosis of human hydatid cyst relapse: utility of the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot and discriminant analysis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **7**, 549-552.

Hernández-González A, Muro A, Barrera I, Ramos G, Orduña A, Siles-Lucas M. (2008). Usefulness of four different *Echinococcus granulosus* recombinant antigens for serodiagnosis of unilocular hydatid disease (UHD) and postsurgical follow-up of patients treated for UHD. *Clinical and Vaccine Immunology* **15**, 147-153.

Hernández-González, Santivañez S, García HH, Rodríguez S, Muñoz S, Ramos G, Orduña A, Siles-Lucas M. (2012). Improved serodiagnosis of cystic echinococcosis using the new recombinant 2B2t antigen. *PloS Neglected Tropical Diseases* **6**, e1714

Junghanss T, da Silva AM, Horton J, Chiodini PL, Brunetti E. (2008). Clinical management of cystic echinococcosis: state of the art, problems, and perspectives. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **79**, 301-311. Review.

Li T, Ito A, Chen X, Sako Y, Qiu J, Xiao N, Qiu D, Nakao M, Yanagida T, Craig PS. (2010). Specific IgG responses to recombinant antigen B and Em18 in cystic and alveolar echinococcosis in China. *Clinical and Vaccine Immunology* **17**, 470-475.

Li T, Ito A, Pengcuo R, Sako Y, Chen X, Qiu D, Xiao N, Craig PS. (2011). Post-treatment follow-up study of abdominal cystic echinococcosis in tibetan communities of northwest Sichuan Province, China. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **5**, e1364.

Margutti P, Ortona E, Vaccari S, Barca S, Riganò R, Teggi A, Muhschlegel F, Frosch M, Siracusano A. (1999). Cloning and expression of a cDNA encoding an elongation factor 1beta/delta protein from *Echinococcus granulosus* with immunogenic activity. *Parasite Immunology* **21**, 485-492.

Nasrieh MA, Abdel-Hafez SK. (2004). *Echinococcus granulosus* in Jordan: assessment of various antigenic preparations for use in the serodiagnosis of surgically confirmed cases using enzyme immuno assays and the indirect haemagglutination test. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **48**, 117-123.

Pan D, Bera AK, Bandyopadhyay S, Das S, Rana T, Das SK, Bandyopadhyay S, Manna B, Bhattacharya D. (2011). Molecular characterization of antigen B2 subunit in two genotypes of *Echinococcus granulosus* from Indian bubaline isolates, its stage specific expression and serological evaluation. *Molecular Biology Reports* **38**, 2067-2073.

Piccoli L, Meroni V, Genco F, Tamarozzi F, Tinelli C, Filice C, Brunetti E. (2012). Serum cytokine profile by ELISA in patients with echinococcal cysts of the liver: a stage-specific approach to assess their biological activity. *Clinical and Developmental Immunology*, ID:483935.

Ravinder PT, Parija SC, Rao KS. (1997). Evaluation of human hydatid disease before and after surgery and chemotherapy by demonstration of hydatid antigens and antibodies in serum. *Journal of Medical Microbiology* **46**, 859-864.

Riganò R, Ioppolo S, Ortona E, Margutti P, Profumo E, Ali MD, Di Vico B, Teggi A, Siracusano A. (2002). Long-term serological evaluation of patients with cystic echinococcosis treated with benzimidazole carbamates. *Clinical and Experimental Immunology* **129**, 485-492.

Rogan MT, Hai WY, Richardson R, Zeyhle E, Craig PS. (2006). Hydatid cysts: does every picture tell a story? *Trends in Parasitology* **22**, 431-438.

Stojkovic M, Zwahlen M, Teggi A, Vutova K, Cretu CM, Virdone R, Nicolaidou P, Cobanoglu N, Junghanss T. (2009). Treatment response of cystic echinococcosis to benzimidazoles: a systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **3**, e524.

Tamarozzi F, Meroni V, Genco F, Piccoli L, Tinelli C, Filice C, Brunetti E. (2010). Ex vivo assessment of serum cytokines in patients with cystic echinococcosis of the liver. *Parasite Immunology* **32**, 696-700.

Vacirca D, Perdicchio M, Campisi E, Delunardo F, Ortona E, Margutti P, Teggi A, Gottstein B, Siracusano A. (2011). Favourable prognostic value of antibodies anti-HSP20 in patients with cystic echinococcosis: a differential immunoproteomic approach. *Parasite Immunology* **33**, 193-198.

WHO Informal Working Group on Echinococcosis. (1996). Guidelines for treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Bulletin of the World Health Organization* **74**, 231-242.

WHO Informal Working Group. (2003). International classification of ultrasound images in cystic echinococcosis for application in clinical and field epidemiological settings. *Acta Tropica* **85**, 253-261.

Zarzosa MP, Orduña Domingo A, Gutiérrez P, Alonso P, Cuervo M, Prado A, Bratos MA, García-Yuste M, Ramos G, Rodríguez Torres A. (1999). Evaluation of six serological tests in diagnosis and postoperative control of pulmonary hydatid disease patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **35**, 255-262.

Zhang WB, Xing Y, Xu XC, Abudukadeer XK, Wang YH, Wen H. (2011). Community survey, treatment and long-term follow up for human cystic echinococcosis in northwest China. *Chinese Medical Journal* **124**, 3176-3179.

## LEGENDS FOR FIGURES

Figure 1. Intensity pattern of the test line supplied by the commercial for the interpretation of the result in the IC strips 0 and S (-) indicate a negative result; 0.5 and S (+) LOW, indicate a weakly positive result; 1 and 2 indicate a positive result, 3 and S (+) HIGH, indicate a strong positive result.

Figure 2. Follow-up of patients cured and non cured after surgery or an aspiration technique. Points represent the IS-50 value (Y axis) of for each sera in the time intervals after surgery (X axis) where 0 indicates before or shortly after surgery, 1, 2 and 3 indicate the first, second and third year after surgery and > 3, indicates sera collected after 3 years of treatment until 11 years. The cut off value is 0. Bold letters indicate the slopes of each tendency line .

Figure 3. Percentage of positivity for each test in the groups of cured patients and non cured patients for different time intervals after intervention. N, indicates number of sera for each time interval; +, indicates the number of positive sera; %, indicates the percentage of positive sera. The graphs represent the percentage of positive sera (Y axis) versus time (X axis).

Figure 4. Follow-up of patients after drug treatment. Points represent the IS-50 value (Y axis) for each sera in the time intervals after treatment (X axis) where 0 indicates before or just at the end of the last cycle of treatment,, 1, 2 and 3 indicate the first, second and third year after treatment and > 3, indicates sera were collected after 3 years of treatment until 11years. The cut off value is 0 and bold letters indicate the slopes of each tendency line .

Figure 5. Percentage of positivity for each test in the groups of good outcome patients and bad outcome patientes for some time periods after intervention. N, indicates number of sera for each time interval; +, indicates the number of positive sera; %, indicates the percentage of positive sera. The graphs represent the percentage of positive sera (Y axis) versus time (X axis).

Figure 6. Box-plot representation of the values of IS-50 (IS) of patients in “watch and wait”, classified according to the cystic stage (X axis). °, extreme values are between

1.5 and 3 times the interquartile on both sides of the box, \*, very extreme values situated more than 3 times the interquartile interquartile or both sides of the box.

Figure 7. Percentages of positivity obtained for each cystic stage for each antigens in “watch and wait” patients (A) and in patients recently treated with albendazole (B). The Y axis shows the percentage of positivity and in each stage cystic X axis.

Figure 8. Intensity values obtained with the immunocromatographic strips of Vircell for patients in follow-up after surgery or an aspiration technique. Int, intensity of the test line according to the commercial (Figure 1), where 0 indicates a negative result. TIME: 0 indicates sera collected before or shortly after surgery or an aspiration technique, 1, 2 and 3 indicate the first, second and third year after intervention, and > 3 indicates sera collected after 3 years until 6.9 years.



## FIGURES

FIGURE 1

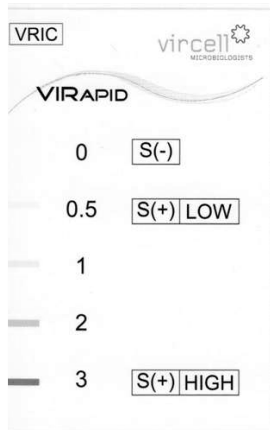


FIGURE 2

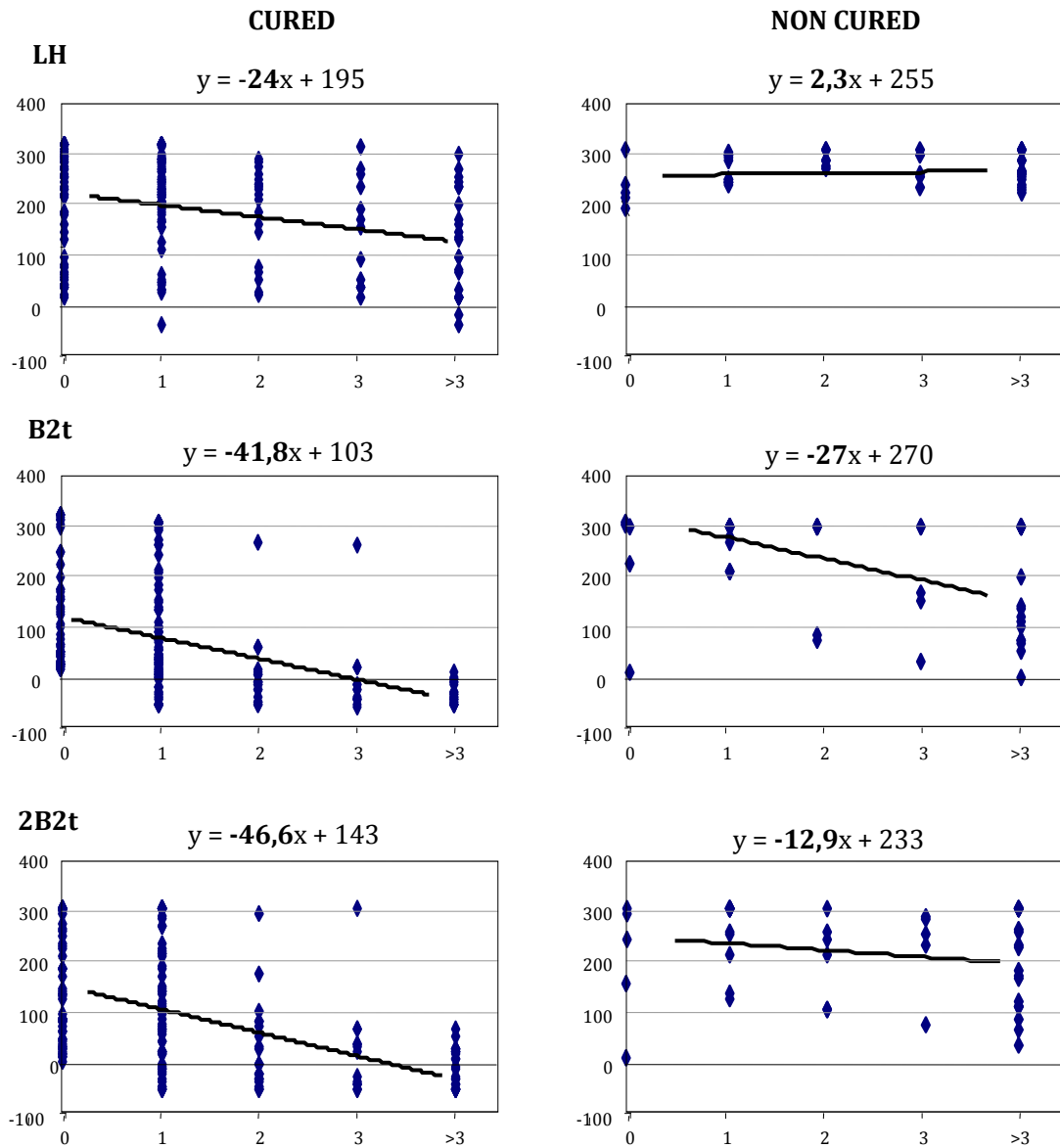
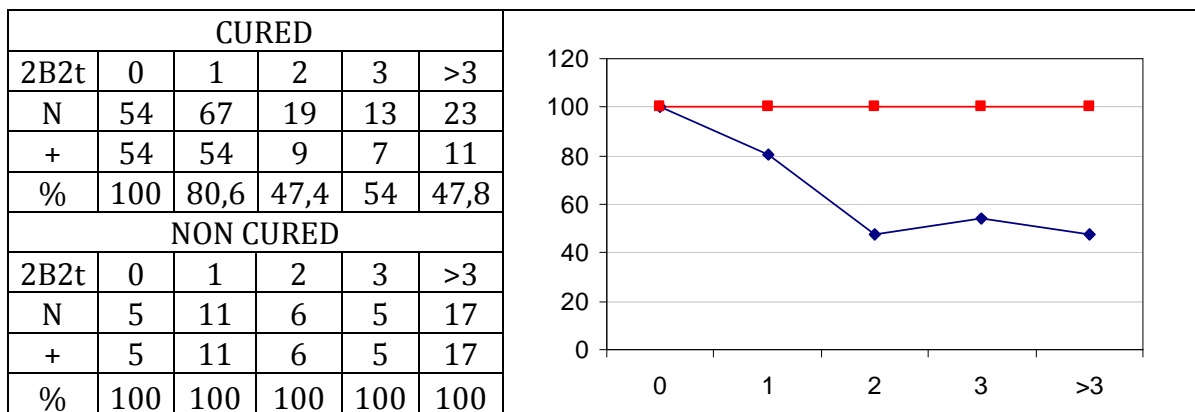
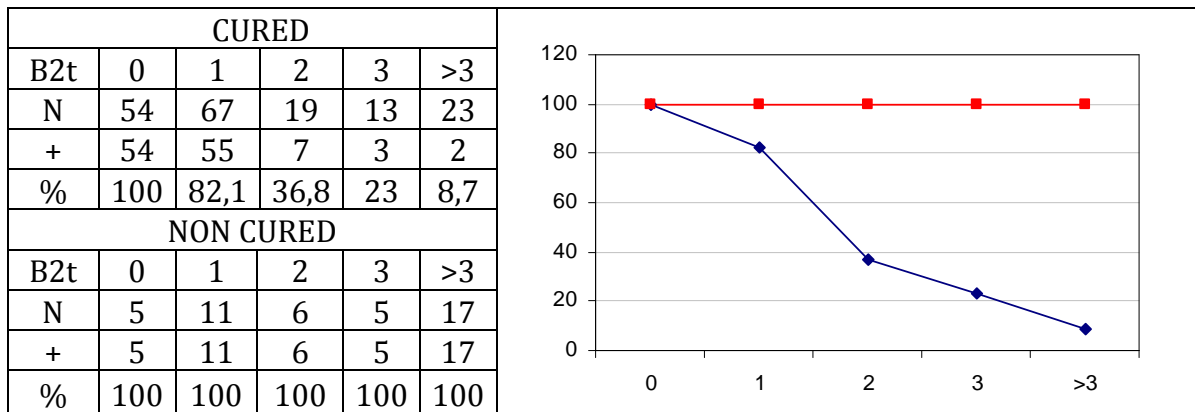
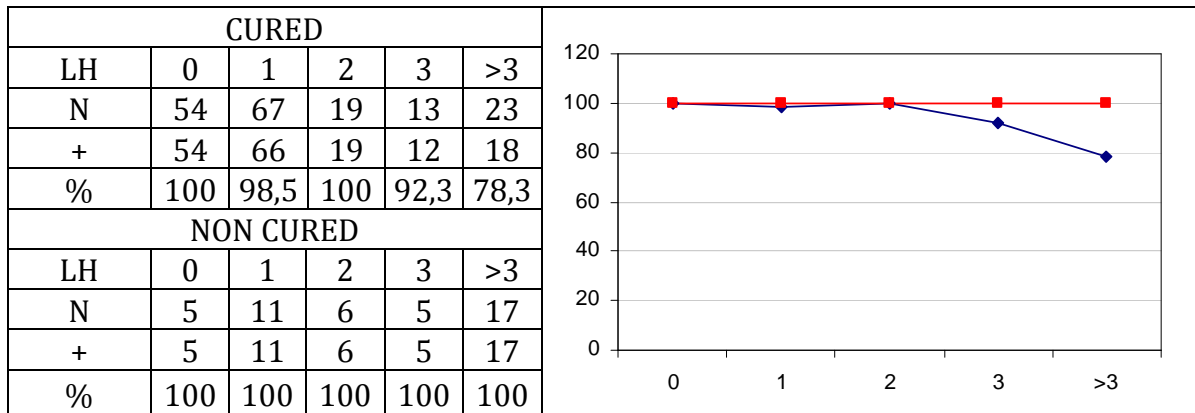


FIGURE 3



—◆— CURED      —■— NON CURED

FIGURE 4

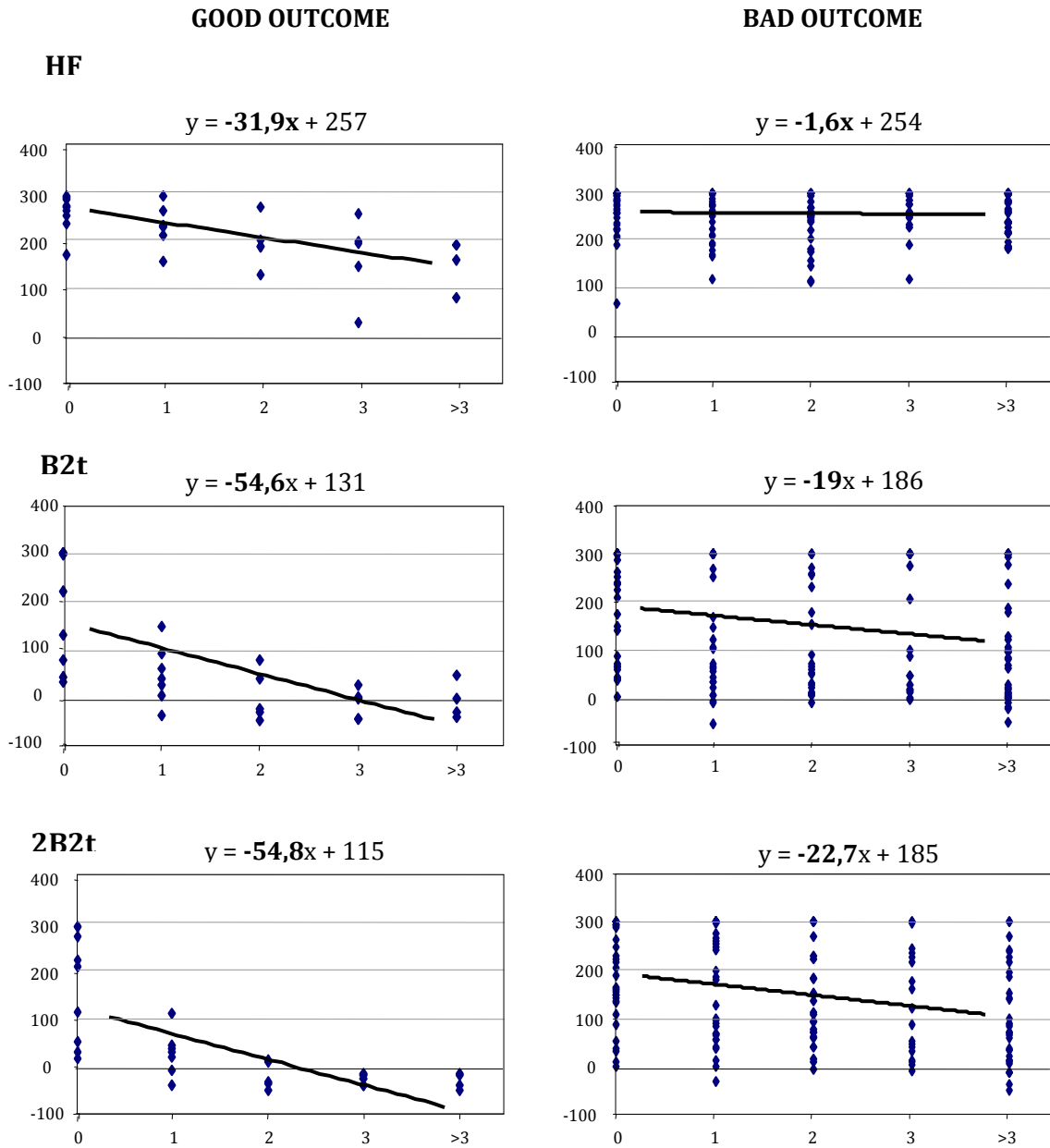
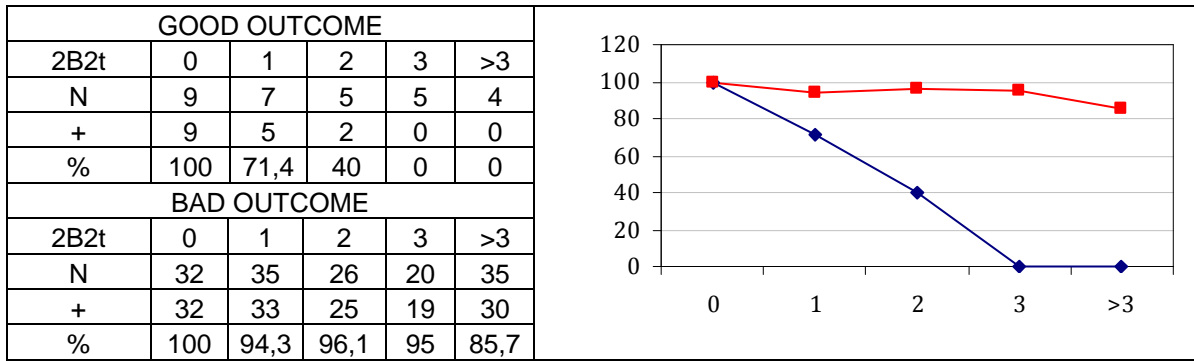
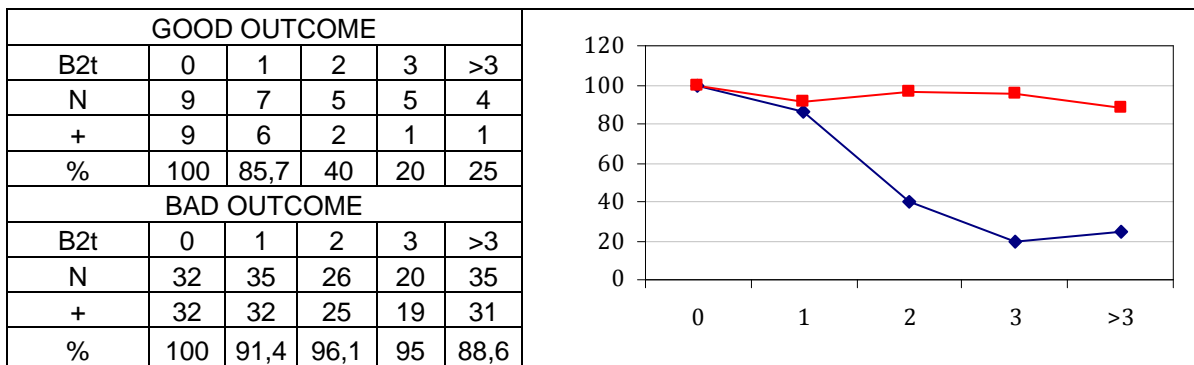
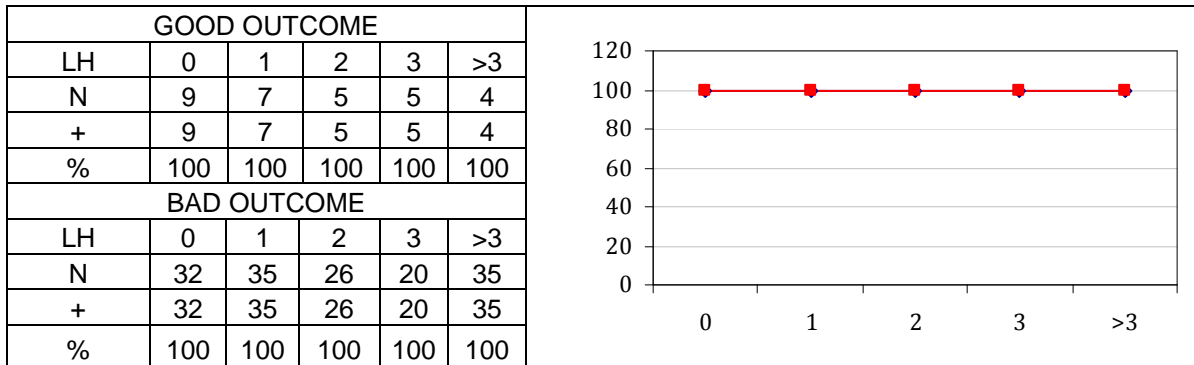


FIGURE 5



—◆— GOOD OUTCOME    —■— BAD OUTCOME

FIGURE 5

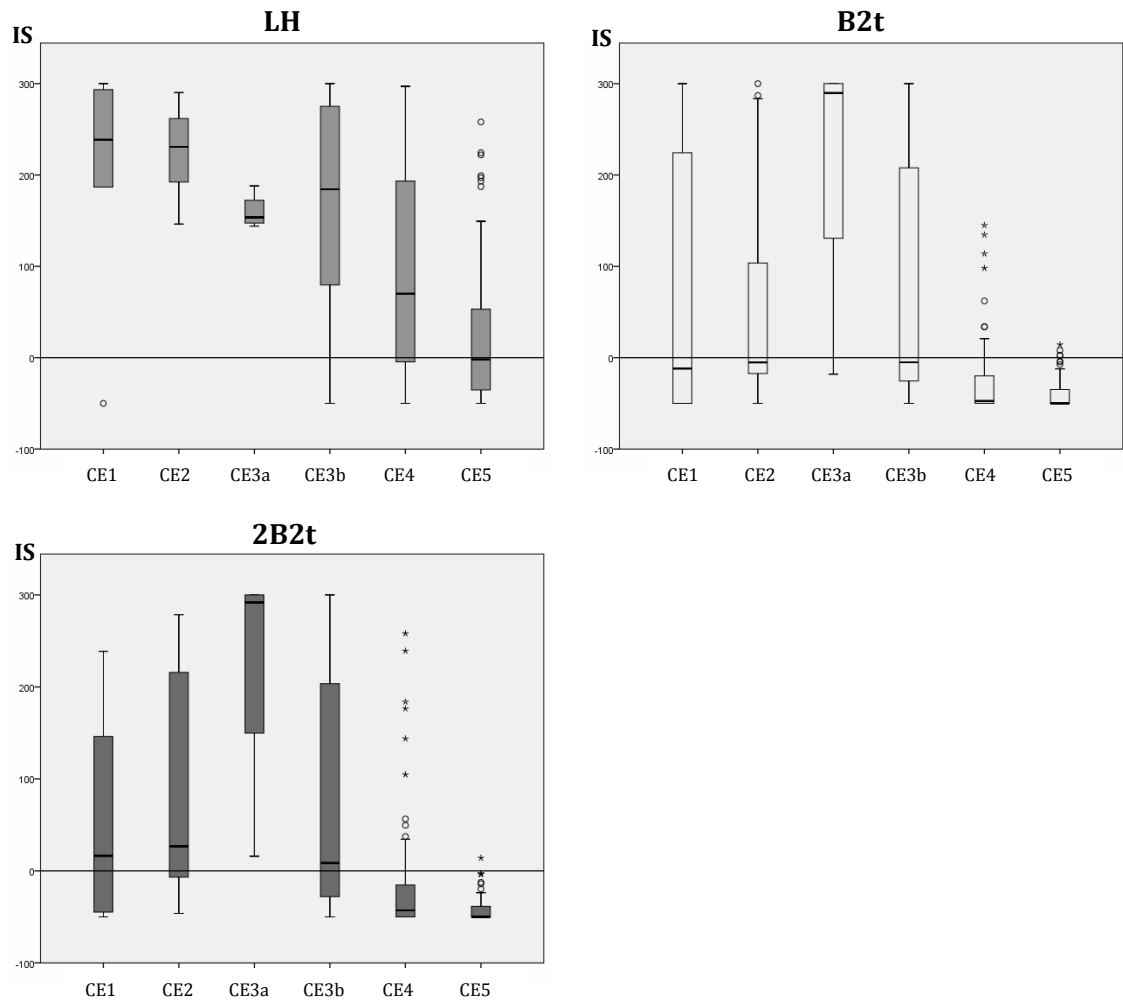


FIGURE 6

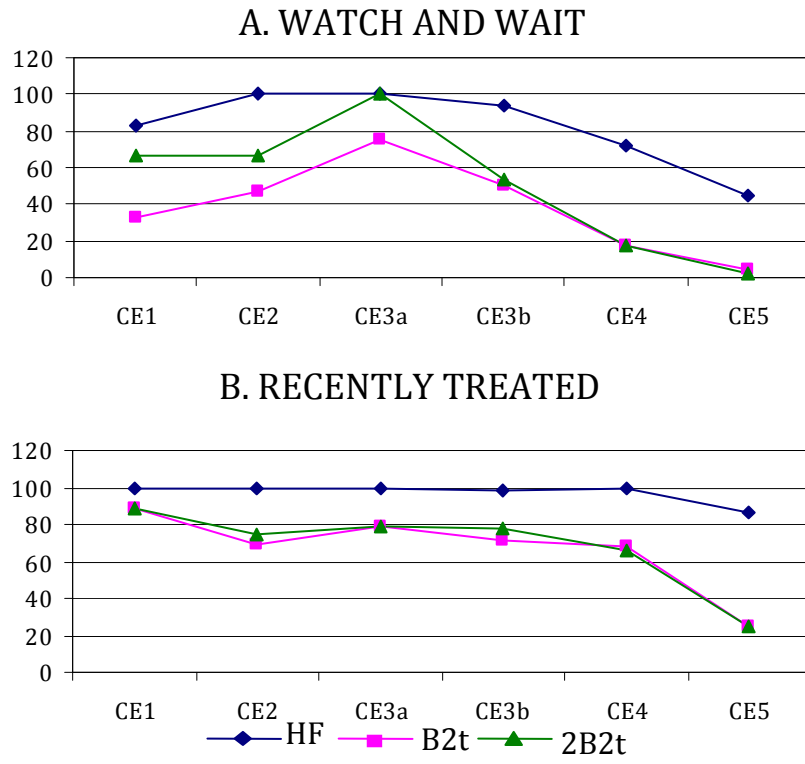
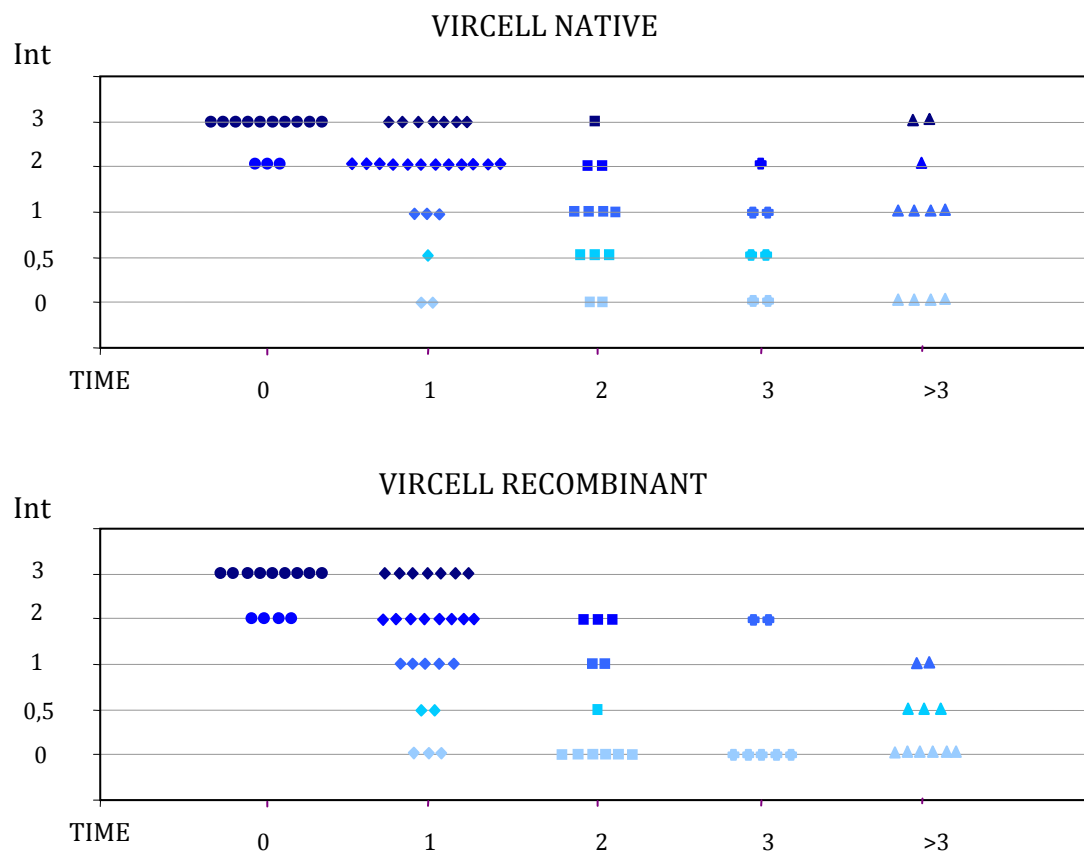


FIGURE 7





## TABLES

Table 1. Number of patients and sera selected for evaluation of serology in monitoring patients under treatment.

<b>FOLLOW-UP AFTER SURGERY OR ASPIRATION</b>	<b>Patients</b>	<b>Sera</b>	<b>Time after treatment</b>				
			<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>&gt;3</b>
<b>TOTAL</b>	71	220	0	1	2	3	>3
<b>Cured</b>	60	176	54	67	19	13	23
<b>Non cured</b>	11	44	5	11	6	5	17

<b>FOLLOW-UP DRUG TREATMENT</b>	<b>Patients</b>	<b>Sera</b>	<b>Time after treatment</b>				
			<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>&gt;3</b>
<b>TOTAL</b>	44	178	0	1	2	3	>3
<b>Good outcome</b>	7	30	9	7	5	5	4
<b>Bad outcome</b>	37	148	32	35	26	20	36

<b>WATCH AND WAIT</b>	<b>Patients</b>	<b>Sera</b>	<b>Cyst classification</b>					
			<b>CE1</b>	<b>CE2</b>	<b>CE3a</b>	<b>CE3b</b>	<b>CE4</b>	<b>CE5</b>
	116	236	6	15	4	32	85	94
<b>RECENTLY TREATED</b>	100	264	9	16	44	131	56	8

Follow-up after surgery or aspiration and after drug treatment: for each time point during follow-up, the number of sera collected are given. 0, includes sera collected before or shortly after any treatment, 1, 2 and 3 indicate the sera collected during the first, second and third year after any treatment, and > 3 indicates sera collected after 3 years of treatment until 11 years. For "watch and wait", the number of sera for each cystic stage is given. "Recently treated" does not correspond to a succession of follow-up sera, it includes sera of patients treated only with drugs and whose sera do not have a date later than two years after the end of the last cycle of treatment.

Table 2. Sera used for the study of the usefulness of diagnostic strips for follow-up of patients cured and non cured after surgery or an aspiration technique.

		<b>Patients</b>	<b>Sera</b>	<b>Time after treatment</b>				
<b>FOLLOW-UP AFTER SURGERY OR ASPIRATION</b>	<b>TOTAL</b>	29	103	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>&gt;3</b>
	<b>Cured</b>	19	68	16	22	12	7	11
	<b>Non cured</b>	10	35	4	7	6	5	13

For each time point during follow-up the number of sera collected is given. 0, includes sera collected before or shortly after surgery, 1, 2 and 3 indicate the sera collected during the first, second and third year after treatment, and > 3 indicates sera collected after 3 years of treatment until 11 years.

Table 3. Percentage of positivity for each cyst stage for patients in “watch and wait” follow-up, and for patients who underwent drug treatment in a time period not exceeding two years from the collection of serum.

**A. WATCH AND WAIT**

	<b>N</b>	<b>HF</b>	<b>B2t</b>	<b>2B2t</b>
<b>CE1</b>	6	83	33	67
<b>CE2</b>	15	100	47	67
<b>CE3a</b>	4	100	75	100
<b>CE3b</b>	32	94	50	53
<b>CE4</b>	85	72	18	18
<b>CE5</b>	94	45	4	2

**B. DRUG TREATMENT**

	<b>N</b>	<b>HF</b>	<b>B2t</b>	<b>2B2t</b>
<b>CE1</b>	9	100	89	89
<b>CE2</b>	16	100	69	75
<b>CE3a</b>	44	100	80	80
<b>CE3b</b>	131	98	71	78
<b>CE4</b>	56	100	68	66
<b>CE5</b>	8	87,5	25	25

The percentage of positive sera in each category for each antigen tested cystic is shown. N indicates the number of sera in each cyst stage.

Table 4. Results obtained with the native and recombinant antigen strips strips and SI values obtained with the ELISA-2B2t.

<b>A. CURED PATIENTS</b>				
<b>Nº</b>	<b>TIME</b>	<b>E-2B2t</b>	<b>REC</b>	<b>NAT</b>
23	0	135	2	2
23	1,8	77	0,5	1
23	2,5	63	0	1
37	0,1	17	1	1
37	0,2	-19	0,5	1
247	0,3	23	2	3
247	0,9	-44	1	2
270	0	81	2	2
270	0,2	181	2	2
270	4,0	6	0,5	1
308	0	183	3	3
308	0,7	-35	0,5	2
308	5,4	-31	0	1
311	0,0	134	3	3
311	0,8	92	2	3
311	2,0	-30	1	3
311	3,3	-32	0,5	3
311	6,9	-43	0,5	3
312	0,1	119	3	3
312	0,9	-15	1	0,5
312	1,6	-36	0	0,5
312	2,5	-42	0	0
312	3,5	-55	0	0
312	4,5	-56	0	0
315	0	219	3	3
315	0,7	68	2	3
315	1,1	97	2	2
317	0	180	3	3
317	0,7	63	1	2
317	2,0	-5	0	1
317	3,6	-25	0	1
336	0,0	313	3	3
336	1,0	105	2	2
336	2,0	71	2	1
336	2,9	23	2	1
339	0	258	3	3
339	0,5	209	3	2
339	1,5	26	1	1
339	2,5	-52	0	0,5
339	4,0	-52	0	0

<b>B. NON CURED PATIENTS</b>				
<b>Nº</b>	<b>TIME</b>	<b>E-2B2t</b>	<b>REC</b>	<b>NAT</b>
1	8,9	27	2	2
1	9,4	160	2	2
1	9,7	106	3	3
1	10,9	300	3	2
3	0	4	3	3
3	1	303	3	2
4	2	101	3	3
4	5	112	3	3
4	6	61	3	3
5	4	165	3	3
5	6	302	3	3
13	1,9	237	3	3
13	2,6	225	3	2
13	3,7	250	3	3
14	0,8	129	3	3
14	1,3	101	3	3
14	2,9	67	3	2
15	0,0	239	3	3
15	0,4	250	3	2
15	0,8	204	3	2
15	1,6	253	3	2
15	2,8	283	3	2
15	3,4	298	3	2
15	3,6	300	2	3
15	4,3	221	3	3
15	5,1	259	3	2
17	0,0	296	3	3
17	0,6	297	3	3
17	2,3	248	3	3
18	0	287	3	3
18	0,3	310	3	3
18	2,4	300	3	3
18	1,7	305	3	3
19	1,0	245	2	0,5
19	2,0	207	2	0,5

<b>PACIENTES CURADOS</b>				
<b>Nº</b>	<b>TIME</b>	<b>E-2B2t</b>	<b>REC</b>	<b>NAT</b>
349	0,2	21	0	0
349	0,6	-7	0	0
349	1,7	-24	0	0
349	2,6	-25	0	0
353	0,0	318	3	2
353	0,8	114	2	2
353	1,2	79	2	2
353	3,9	49	1	2
361	0	332	3	3
361	0,7	284	3	2
361	2,4	36	2	2
361	3,4	8	1	1
387	0	80	2	3
387	1,0	-57	0	1
387	1,9	-56	0	0,5
387	2,9	-41	0	0,5
391	1,0	138	2	2
391	1,2	-46	0	0,5
391	3,3	-58	0	0
398	0,2	67	2	2
398	1,3	-45	0	0
407	0,0	71	2	3
407	0,5	-32	1	2
412	0,0	271	3	3
412	0,1	375	3	3
412	0,2	316	3	3
412	0,3	299	3	3
412	0,5	218	3	2

No., patient number, Time, time (years) between the intervention and serum collection; E-2B2t, SI-50 values obtained in ELISA-2B2t so that values <0 are considered negative results, REC, results obtained with the strips containing the recombinant antigen 2B2t, NAT, results obtained with the strips containing the native antigen. The values 0.5 to 3 correspond to the intensity shown on the test line regarding to the pattern supplied by the commercial.



## **10. ANEXO II. PATENTE**

---







MINISTERIO  
DE INDUSTRIA, TURISMO  
Y COMERCIO



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

## Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201030983	
Fecha de recepción:	25 junio 2010, 13:18 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	ES1641.708	
Solicitante:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)	
Número de solicitantes:	1	
País:	ES	
Título:	PROTEINA PARA EL DIAGNOSTICO Y EL SEGUIMIENTO INMUNOLOGICO DE LA HIDATIDOSIS	
Documentos enviados:	Descripcion-1.pdf (25 p.) Reivindicaciones-1.pdf (4 p.) Resumen-1.pdf (1 p.) Dibujos-1.pdf (1 p.) FEERCPT-1.pdf (1 p.) SEQLPDF.pdf (7 p.) SEQLTXT.txt	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=ENTIDAD PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL - CIF B84921709 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J,OU=703015345,OU=fnmt clase 2 ca,O=FNMT,C=es	
Fecha y hora de recepción:	25 junio 2010, 13:18 (CEST)	
Codificación del envío:	2C:12:77:F5:8E:25:67:D0:E5:AB:11:BE:F9:48:AD:07:BE:3C:16:8A	

/Madrid, Oficina Receptora/



(9) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(10) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERÍA BIOLÓGICA:	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(12) DEPÓSITO: REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):		
(13) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS: LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS		<input checked="" type="checkbox"/>
(14) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR: FECHA:	
(15) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:	
(16) AGENTE/REPRESENTANTE:	APELLIDOS: NOMBRE: CÓDIGO DE AGENTE:  NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/CIF/PASAPORTE:  DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO:  NÚMERO DE PODER:	PONS ARIÑO ANGEL 0499/5  España ES 50534279-J  GLORIETA DE RUBÉN DARIO, 4 MADRID 28 Madrid 28010 España ES    20081765
(17) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:	DESCRIPCIÓN: REIVINDICACIONES:  DIBUJOS: RESUMEN: FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: ARCHIVO DE PRECONVERSION: DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: JUSTIFICANTE DE PAGO (1): LISTA DE SECUENCIAS PDF: ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: OTROS (Aparecerán detallados):	<input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 25 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 26 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de dibujos: 3 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input type="checkbox"/> N.º de figura(s): <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 7 <input checked="" type="checkbox"/>

<p>(18) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMIENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA DNI:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA OTROS:</p>	<p>[ ]</p> <p>[ ] N.º de páginas:</p> <p>[ ] N.º de páginas:</p> <p>[ ] N.º de páginas:</p> <p>[ ] N.º de páginas:</p> <p>[ ] N.º de páginas:</p> <p>[ ] N.º de páginas:</p>
<p>(19) NOTAS:</p>	
<p>(20) FIRMA:</p> <p style="text-align: center;">FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE:</p> <p style="text-align: right;">LUGAR DE FIRMA:</p> <p style="text-align: right;">FECHA DE FIRMA:</p>	<p>ENTIDAD PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL - CIF B84921709 - NOMBRE PONS ARINO ANGEL - NIF 50534279J Madrid 25 Junio 2010</p>

### Identificación

Ejercicio: 2010  
Nro. Justificante: 7915111647816

### Sujeto Pasivo:

N.I.F.: Apellidos y Nombre o Razón social:

Calle/Plaza/Avda.: Nombre de la vía pública: N° Esc Piso Puerta Tfno.

Municipio: Provincia: Código Postal:

### Agente o Representante legal: (1)

N.I.F.: Apellidos y Nombre o Razón social:

**B84921709 PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL**

Calle/Plaza/Avda.: Nombre de la vía pública: N° Esc Piso Puerta Tfno.

Municipio: Provincia: Código Postal:

Código de Agente o Representante: (2) Dígito de control:

**0000**

**0**

### Autoliquidación

Titular del expediente si es distinto del pagador:

**Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**

Expediente Modalidad: **P** Número: Tipo: (3)

Clave: **IE01** Año: **2010** Concepto: **Solicitud de Invencción por Internet**

Unidades: **1** Importe: **68,0**

Referencia OEPM: **88025968355**



909992100200188025968355

### Declarante

Fecha: **25/06/2010**

Firma:

**PONS PATENTES  
Y MARCAS  
INTERNACIONAL  
SL**

### Ingreso

Importe en Euros:

Adeudo en cuenta:



Entidad: **2100** Oficina: D.C. Nro. Cuenta

NRC Asignado: 7915111647816DCB663604

- (1) Solo cuando el pago se realice con cargo a la cuenta corriente del representante o agente.
- (2) En el caso de que tenga asignado un número por la OEPM.
- (3) En el caso de patentes europeas, se pondrá una P si es el número de publicación o una S si es el número de solicitud.
- (4) Una copia de este impreso se acompañará con la presentación de documentación en la OEPM.



<b>OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS</b>		
<b>Hoja informativa sobre pago de tasas de una solicitud de patente o modelo de utilidad</b>		
<b>1. REFERENCIA DE SOLICITUD</b>	<b>ES1641.708</b>	
<b>2. TASAS</b>	<b>Importe (en euros)</b>	
<b>Concepto</b>	<b>Código de barras asignado</b>	<b>Importe</b>
Solicitud de demanda de depósito o de rehabilitación.	88025968355	68,00
Solicitud de cambio de modalidad en la protección		0,00
Prioridad extranjera (0)		0,00
Petición IET		0,00
El solicitante se acoge a la exención del pago de tasas	<input type="checkbox"/>	
El solicitante es una Universidad pública	<input type="checkbox"/>	
	<b>Importe total</b>	68,00
	<b>Importe abonado</b>	68,00
	<b>Importe pendiente de pago</b>	0,00

Se ha aplicado el 15% de descuento sobre la tasa de solicitud de acuerdo con la D. Adic. 8.2 Ley de Marcas.

Si no hubiera realizado el pago previamente al envío de la solicitud, consignando los números del código de barras en la casilla correspondiente, recibirá una notificación de la Oficina Española de Patentes y Marcas a partir de la recepción de la cual tendrá un mes para realizar dicho pago.

Transcurrido este plazo, sin que se hubiera procedido al pago de la tasa de solicitud, la solicitud de patente de invención o de modelo de utilidad se tendrá por desistida.

## **11. ANEXO III. PREMIO**

---





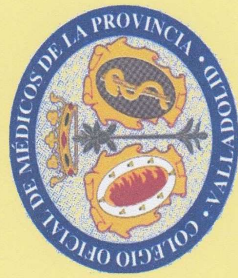
# PREMIOS DE INVESTIGACIÓN en Medicina / 2007

Convocados por el Colegio Oficial de Médicos de Valladolid  
a través de su Fundación para la Formación



concedido a :  
por el trabajo :

figurando como :



El Tribunal, convocado al efecto, reunido en la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid el día 16 de Mayo de 2008, de acuerdo a lo establecido en las bases de la Convocatoria, ha decidido conceder:

## 1º Premio Fundación

**Dña. ANA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ**

*"Validez de una nueva técnica (Elisa-B2t) para el diagnóstico de la hidatidosis humana en comparación con una técnica comercial de rutina (hemaglutinación)"*

**PRIMERA AUTORA**

En Valladolid a 16 de Mayo de 2008

**D. Francisco Javier Arroyo García**  
Presidente del Ilustre Colegio Oficial de Médicos de Valladolid  
y del Patronato de la Fundación para la Formación



**D. Ángel Martín Pastor**  
Secretario del Tribunal Calificador y Director de la Fundación  
para la Formación del Colegio Oficial de Médicos de Valladolid



# **VALIDEZ DE UNA NUEVA TÉCNICA (ELISA-B2t) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA HIDATIDOSIS HUMANA EN COMPARACIÓN CON UNA TÉCNICA COMERCIAL DE RUTINA (HEMAGLUTINACIÓN)**

Ana Hernández-González y Mar Siles-Lucas

*IRNASA, CSIC, Cordel de Merinas, 50, 37008 Salamanca, España*

## **RESUMEN**

El diagnóstico inmunológico de la hidatidosis en la actualidad se lleva a cabo mediante técnicas anticuadas que presentan valores bajos de sensibilidad y especificidad. En este trabajo comparamos la validez diagnóstica de un kit de hemaglutinación indirecta (HAI) utilizado en hospitales y clínicas con una técnica inmunológica, el Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) en la que se incluye un nuevo antígeno recombinante denominado B2t. Se comparan sus resultados con el Gold Standard ELISA-líquido hidatídico (ELISA-LH). Para esta comparación, utilizamos un total de 174 sueros de pacientes con hidatidosis y sueros de pacientes con otras parasitosis. A pesar de la sensibilidad y especificidad indicada por la casa comercial para el kit (93% y 94,9%), nuestros resultados muestran valores muy diferentes a éstos, 45,1% y 95,83% respectivamente. Tras el análisis estadístico de los datos mediante curvas ROC, demostramos que el ELISA con el antígeno recombinante B2t, resulta ser el test más eficaz para el diagnóstico de la hidatidosis con un valor de ABC (área bajo la curva) de 0,932 es, por tanto, un buen candidato para sustituir las actuales técnicas serodiagnósticas que se utilizan rutinariamente en la práctica clínica.

## INTRODUCCIÓN

La hidatidosis es una zoonosis causada por la fase larvaria del cestodo *Echinococcus granulosus*. En Europa la hidatidosis humana es importante en países de la cuenca Mediterránea donde el ciclo doméstico más habitual se mantiene entre el perro y la oveja (rev. en Romig y cols., 2006). La importancia de esta enfermedad parasitaria en España es indiscutible debido a las considerables repercusiones sanitarias y económicas que produce. Por esta causa, la hidatidosis ha sido una enfermedad de inclusión en el grupo de “Enfermedades de Declaración Obligatoria” (EDO; BOE 15/01/1982) hasta 1997. La incidencia estimada en Castilla y León con el sistema EDO en el año 2006 es de 2,97 casos por 100.000 habitantes, aunque es muy probable que los datos existentes infravaloren, al igual que lo descrito en otras zonas, la dimensión real de esta zoonosis (Pardo y cols., 2005).

En el ciclo doméstico de este parásito, el perro actúa como hospedador definitivo conteniendo el verme adulto en su intestino. En humanos, tras la ingesta accidental de los huevos excretados al medio, el parásito viaja a través del torrente sanguíneo ubicándose normalmente en el hígado o pulmón (Ramos y cols., 2001). Una vez establecido, sufre una serie de transformaciones hasta dar lugar al llamado metacestodo o quiste hidatídico. La patología de esta parasitosis está asociada al gradual crecimiento del quiste, así como a su posible ruptura pudiendo dar lugar a una gran variabilidad de síntomas dependiendo del tamaño, localización, número de quistes y de su integridad (Schwabe, 1986). Es por ello que hacer un diagnóstico en base a la sintomatología no es fácil, ya que los síntomas nunca son patognomónicos.

El diagnóstico clínico de la hidatidosis se realiza mediante técnicas de imagen y posterior confirmación de las mismas con técnicas serológicas (OMS, 2003). De estas segundas técnicas las más utilizadas son el enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), la hemaglutinación indirecta (HAI) y la inmunoelectroforesis (IEF), basadas en la detección de anticuerpos específicos frente a antígenos parasitarios en el suero del paciente (Sbihi y cols., 2001). Sin embargo la mayoría de las técnicas serológicas actualmente aplicadas presentan bajos valores de sensibilidad y especificidad (rev. en Carmena y cols., 2006). Esto se debe principalmente a la falta de estandarización de antígenos y reactivos, ya que generalmente se emplean

preparados totales del parásito, como el líquido hidatídico (LH), que consisten en mezclas antigénicas complejas y variables, dando lugar a reactividades cruzadas con otros agentes infecciosos y bajas sensibilidades. Una alternativa para mejorar la especificidad de estos tests, sería la de emplear antígenos unitarios del parásito, bien purificados, sintéticos o en forma recombinante (rev. en Zhang y cols., 2003). Entre los distintos antígenos que se han ensayado para el diagnóstico destacan por su inmunogenicidad y especificidad el antígeno 5 y las subunidades del complejo B (B1 y B2) que se encuentran en altas concentraciones en el líquido hidatídico (rev. en Zhang y McManus, 2006). Estos segundos antígenos han dado lugar a los mejores resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad empleados en diferentes técnicas (rev. en Carmena y cols., 2006).

A pesar de los resultados aportados en numerosos trabajos, en hospitales y clínicas se siguen utilizando kits comerciales de diagnóstico anticuados con una baja eficiencia diagnóstica.

En este trabajo, comparamos una nueva herramienta para el diagnóstico de la hidatidosis con otra utilizada actualmente en clínica, en un intento de encontrar alternativas con mejores cualidades diagnósticas que aquellas de las que se dispone.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### *Obtención de los antígenos LH y B2t y comprobación de su integridad*

El LH se obtuvo a partir de quistes desarrollados en ovinos procedentes de diversos mataderos. El LH se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 minutos para eliminar las partículas sólidas. La concentración de proteínas en el LH se calculó con el kit Micro BCATM Protein Assay (Pierce), almacenándose a -80°C hasta su uso.

El antígeno recombinante B2t se obtuvo del siguiente modo: a partir del ARN extraído de quistes ovinos con el kit Rneasy Protect Mini (Qiagen) se realizó una transcripción reversa con el kit First Strand cDNA Síntesis kit (Roche). Sobre el ADNc complementario resultante se llevó a cabo una PCR de 30 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 48°C y 1 minuto a 72°C con los cebadores: B2Fwd (5'-AAAGATGAGCCAAAAGCAC) – B2Rev (5'-AGGCAAATCATGTGTCCCG) obteniendo un

producto de 241 pares de bases. Este fragmento se subclonó en el vector de expresión pGEX-4T1 y con él se transformaron células de la cepa BL21 CodonPlus-RIL de *Escherichia coli* (Stratagene). La inducción de la expresión de la proteína recombinante se hizo con IPTG a una concentración de 0,2 mM y su purificación se llevó a cabo mediante corte con trombina tras el pegado de la proteína a resina glutationa sepharose 4B, tal como describen Virginio y cols., 2003.

Ambos antígenos se observaron tras electroforesis en geles de acrilamida al 12%, teñidos con azul de Coomassie.

### *Sueros*

En este estudio utilizamos un total de 174 sueros. De ellos, 102 correspondían a pacientes con hidatidosis confirmada quirúrgicamente, 32 a pacientes con otras parasitosis especialmente relacionadas con la hidatidosis con confirmación serológica y/o parasitológica (10 de pacientes con hidatidosis alveolar, 12 de pacientes con cisticercosis y 10 con teniosis) y 40 sueros procedentes de un banco de donantes de sangre.

### *Hemaglutinación indirecta*

Sobre los sueros anteriormente detallados, realizamos la técnica de hemaglutinación indirecta con el kit comercial Hydatidose Fumouze basado en la detección de anticuerpos IgG frente a una fracción purificada nativa del antígeno 5. La técnica se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el kit. Se consideraron positivos aquellos sueros que presentaron aglutinación en la dilución 1/320, valor de corte dado por el kit. Así mismo se realizó también un control de aglutininas para cada uno de los sueros testados.

### *ELISA*

Sobre los mismos sueros utilizados en HAI, llevamos a cabo la técnica ELISA utilizando el antígeno nativo líquido hidatídico (5 µg/ml) y la proteína recombinante B2t (0.5 µg/ml) tal como se describe en Hernández-González y cols., 2008.

## Estadística

Para el análisis de los resultados obtenidos con cada una de las técnicas realizadas utilizamos el programa estadístico Epidat versión 3.1 (programa para análisis epidemiológico de datos tabulados). De esta forma se calcularon los parámetros: sensibilidad, especificidad intervalo de confianza al 95% en cada caso, para cada técnica. Para determinar la validez diagnóstica de cada uno de los tests se recurrió al análisis estadístico de las curvas ROC, calculando para cada prueba el valor de área bajo la curva (ABC) ya que este es un valor representativo de la eficiencia diagnóstica englobando todos los posibles valores de sensibilidad y especificidad del test. Para la comparación de los valores de ABC obtenidos en cada prueba, se utilizó el test de ji- cuadrado.

## RESULTADOS

### *Obtención de antígenos parasitarios*

Tras el tratamiento del LH extraído de quistes de oveja y tras ser liofilizado, parte del mismo se resuspendió en 1 ml de agua destilada para ser utilizado en ELISA. La concentración proteica de esta solución se determinó mediante el kit Micro BCATM Protein Assay (Pierce), siendo de 36  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . La integridad de los antígenos se comprobó por electroforesis en geles de acrilamida y tinción con azul de Coomasie (Figura 1).

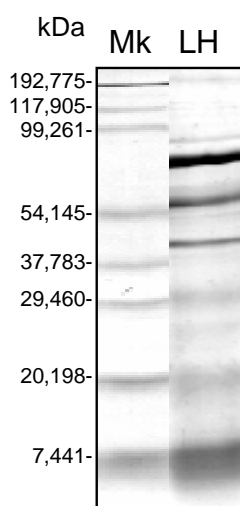


FIGURA 1. Gel de poliacrilamida al 12%, mostrando el patrón proteico del LH que se utilizó como antígeno en la técnica de ELISA (18  $\mu\text{g}$ ), teñido con azul de Coomasie. Mk, marcadores de peso molecular (Biorad). Los pesos moleculares se muestran a la izquierda de la figura en kilodaltons

La proteína recombinante B2t se obtuvo con un rendimiento de 0,5 mg de proteína por litro de medio de cultivo procesado.

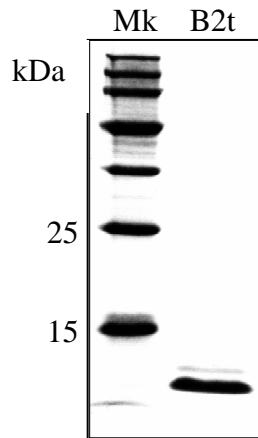


FIGURA 2. Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie donde se muestra la proteína recombinante B2t y el marcador de peso molecular (Mk, Roche). Los pesos moleculares se muestran a la izquierda de la figura, en kilodaltons (kDa).

### *Técnicas de inmunodiagnóstico*

Los resultados obtenidos con el kit comercial de hemaglutinación indirecta, con el ELISA-LH y con el ELISA-B2t, expresados como número de positivos y negativos para cada grupo de sueros aparecen representados en la Tabla 1.

A partir de estos datos se calculó la sensibilidad y especificidad de las técnicas, presentados en la Tabla 2.



TABLA 1. Número de sueros positivos y negativos obtenidos con el kit comercial de HAI, el ELISA-LH y el ELISA-B2t

TÉCNICAS PRUEBA	PRUEBA DE REFERENCIA		
	ENFERMOS +/-	SANOS +/-	OTRAS +/-
<b>HAI</b>	45/56	0/40	3/29
<b>ELISA-LH</b>	89/13	0/40	19/13
<b>ELISA-B2t</b>	93/9	0/40	2/30
<b>TOTAL</b>	102	40	32

Prueba de referencia: confirmación quirúrgica en los casos de hidatidosis, confirmación parasitológica y/o serológica en el resto de parasitosis.

TABLA 2. Cálculo de la sensibilidad y especificidad para las técnicas de HAI, ELISA-LH y ELISA-B2t. IC, intervalo de confianza.

	<b>HAI</b>	<b>ELISA-LH</b>	<b>ELISA-B2t</b>
<b>SENSIBILIDAD (%)</b>	45,1	87,25	91,18
<b>IC (95%)</b>	(34,95-55,24)	(80,29-94,22)	(85,18-97,17)
<b>ESPECIFICIDAD (%)</b>	95,83	73,61	97,22
<b>IC (95%)</b>	(90,52-100)	(62,74-84,49)	(92,73-100)

### *Comparación de las técnicas serológicas utilizadas mediante curvas ROC*

Para determinar la validez de cada una de las pruebas diagnósticas se recurrió al análisis estadístico de las curvas ROC (Figura 3) con las que pudimos hacer una comparación más directa entre las distintas técnicas realizadas a través del valor de ABC (Tabla 3).

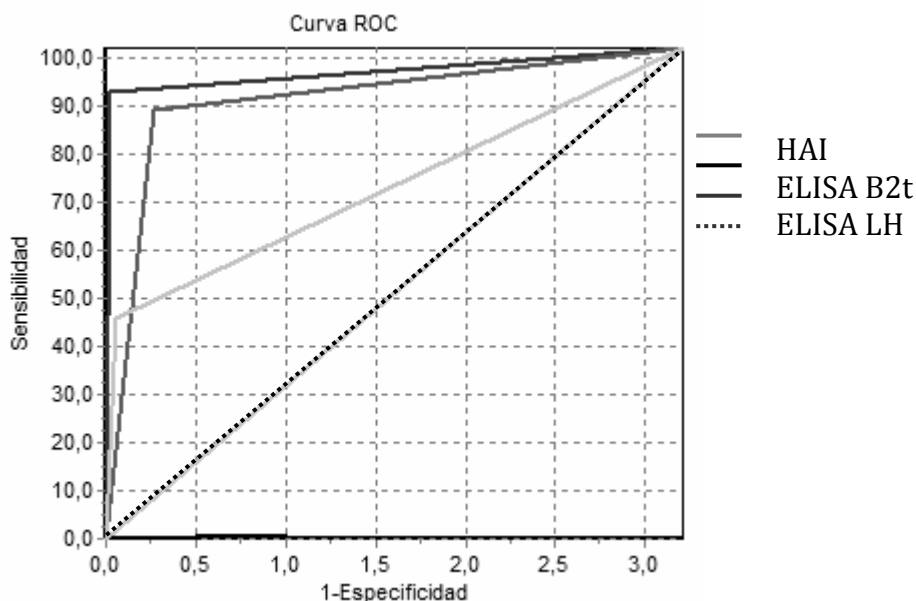


FIGURA 3. Comparación de curvas ROC de las técnicas HAI, ELISA-LH y ELISA-B2t. Los parámetros utilizados fueron: Número de curvas: 3, Número de categorías: 2, Nivel de confianza: 95%

TABLA 3. Comparación de los valores de área bajo la curva ROC para cada prueba. EE-error estándar de DeLong, IC-intervalo de confianza.

CURVA	AREA ROC	EE (DeLong)	IC (95%)
<b>B2t</b>	0,9325	0,0195	0,8944-0,9706
<b>LH</b>	0,8136	0,0308	0,7532-0,8739
<b>HAI</b>	0,7454	0,0282	0,69-0,8008

## CONCLUSIONES

El diagnóstico clínico del quiste hidatídico en pacientes se ve complicado por la ausencia de síntomas en muchos casos y por la falta de especificidad de los mismos cuando se presentan (Schwabe, 1986). Al sospechar de una hidatidosis, se suele recurrir a técnicas de imagen como primera aproximación diagnóstica, y al diagnóstico inmunológico como segunda prueba para confirmar los datos obtenidos. Sin embargo, el diagnóstico inmunológico de la hidatidosis que se realiza en la práctica clínica presenta aún problemas en cuanto a su especificidad y sensibilidad, entre otros.

En varios hospitales se usa como técnica de rutina para el diagnóstico serológico de la hidatidosis un kit de hemaglutinación indirecta (Hydatidose Fumouze) que detecta anticuerpos frente a una fracción purificada nativa del antígeno 5 del LH, habiendo definido la casa comercial que da lugar a una sensibilidad del 93% y una especificidad del 94,9%, sin referirse detalladamente en esta definición ni al número ni a las características de los sueros utilizados para llegar a estos resultados. Utilizando en este estudio una batería de sueros bien definida y caracterizada hemos obtenido para este kit una sensibilidad de 45,1%, muy inferior a la mostrada por la técnica ELISA utilizando antígenos diferentes (87,25% para el LH y 91,18% para el B2t). Esto puede deberse a la mayor sensibilidad de la técnica de ELISA en comparación con la HAI, ya demostrada por numerosos autores (pe., Sbihi y cols., 2001; Nasrieh y Abdel-Hafez, 2004), y también a las características de los antígenos. Con respecto a esto, nuestros resultados comparativos resultan lógicos, puesto que en general se atribuye mayor inmunorreactividad al antígeno B que al antígeno 5 (Barbieri y cols., 1998).

En cuanto a la especificidad, con el kit de hemaglutinación hemos encontrado un valor muy aproximado al indicado por la casa comercial, 95,8%, y superior al obtenido con el ELISA-LH (73,61%). Estas diferencias se podrían atribuir a que los antígenos utilizados son diferentes, y como el LH es una mezcla multiantigénica bruta presente un mayor número de reacciones cruzadas que un antígeno purificado como el utilizado por el kit. En cualquier caso, el ELISA-B2t presenta el mayor valor de especificidad -97,22%-.

En conjunto, las curvas ROC muestran como técnica más eficaz para el diagnóstico de la hidatidosis el ELISA-B2t, seguido del ELISA-LH, con unos valores de ABC de 0,932 y 0,813 respectivamente, quedando al final el kit de HAI con un valor ABC de 0,745.

Apoyándonos en los resultados obtenidos en este trabajo para el ELISA-B2t, podemos concluir que su aplicabilidad práctica supera con creces aquella descrita para uno de los kits diagnósticos más frecuentemente utilizados en la actualidad para el diagnóstico de la hidatidosis humana en la práctica clínica, y que por tanto podría constituir una herramienta comercializable con una aplicación práctica inmediata.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Barbieri M, Fernandez V, Gonzalez G, Luaces VM, Nieto A. 1998. Diagnostic evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hydatidosis. *Parasite Immunol.* 20(2):51-61.

Carmena D, Benito A, Eraso E. 2006. Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. *Acta Trop.* 98(1):74-86.

Hernández-González A, Muro A, Barrera I, Ramos G, Orduña A, Siles-Lucas M. 2008. Usefulness of four different *Echinococcus granulosus* recombinant antigens for serodiagnosis of unilocular hydatid disease (UHD) and postsurgical follow-up of patients treated for UHD. *Clin Vaccine Immunol.* 15(1):147-53.

Nasrieh MA, Abdel-Hafez SK. 2004. *Echinococcus granulosus* in Jordan: assessment of various antigenic preparations for use in the serodiagnosis of surgically confirmed cases using enzyme immuno assays and the indirect haemagglutination test. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 48(2):117-23.

OMS/WHO Informal Working Group on Echinococcosis. 2003. International classification of ultrasound images in cystic echinococcosis for application in clinical and field epidemiological settings. *Acta Trop.* 85(2):253-61.

Pardo J, Muro A, Galindo I, Cordero M, Carpio A, Siles-Lucas M. 2005. Hidatidosis en la provincia de Salamanca: ¿debemos bajar la guardia? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 23(5): 266-9.

Ramos G, Orduna A, Garcia-Yuste M. 2001. Hydatid cyst of the lung: diagnosis and treatment. *World J Surg.* 25(1):46-57.

Romig T, Dinkel A, Mackenstedt U. 2006. The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol Int.* 55:S187-91.

Sbihi Y, Rmiqui A, Rodriguez-Cabezas MN, Orduna A, Rodriguez-Torres A, Osuna A. 2001. Comparative sensitivity of six serological tests and diagnostic value of ELISA using purified antigen in hydatidosis. *J Clin Lab Anal.* 15(1):14-8.

Schwabe. 1986. Current status of hydatid disease: a zoonosis of increasing importance. En: Thompson, R.C.A. (Ed.), *The biology of Echinococcus and Hydatid Disease.* Allen & Unwin Pty., Limited (Australia), pp. 81-113.

Virginio, VG, Hernandez A, Rott MB, Monteiro KM, Zandonai AF, Nieto A, Zaha A, Ferreira HB. 2003. A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clin. Exp. Immunol.* 132:309-315.

Zhang W, Li J, McManus DP. 2003. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin Microbiol Rev.* 16(1):18-36.

Zhang W, McManus DP. 2006. Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 47(1):24-41.