

Precisión de la determinación de ELISA-IgE y ELISA-IgG en el seguimiento postoperatorio de pacientes con hidatidosis hepática

Carlos Manterola^{a,b}, Manuel Vial^{a,b}, Pilar Schneeberger^a, Juan Luis Peña^a, Jaime Hinojosa^c y Antonio Sanhueza^{a,b}

^aDepartamento de Cirugía. Universidad de La Frontera. Temuco. Chile.

^bCIGES. Capacitación, Investigación y Gestión para la Salud Basada en Evidencia. Universidad de La Frontera. Temuco. Chile.

^cLaboratorio Clínico. Hospital Regional de Temuco. Temuco. Chile.

Resumen

Introducción. El seguimiento de pacientes intervenidos quirúrgicamente por hidatidosis hepática (HH) es fundamental para poder asegurar ausencia de infección. El objetivo de este trabajo ha sido determinar el comportamiento en el tiempo de las inmunoglobulinas (Ig) G y E específicas para *Echinococcus granulosus* mediante la técnica de ELISA (ELISA-IgG y ELISA-IgE) en individuos intervenidos quirúrgicamente por HH.

Material y método. Cohorte concurrente de individuos intervenidos quirúrgicamente por HH entre 1994 y 2003 en el Hospital Regional de Temuco (Chile). Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia de pacientes con seguimiento mínimo de 48 meses y determinaciones cualitativas anuales de ELISA-IgE y ELISA-IgG. Se aplicó estadística descriptiva, con cálculo de porcentajes, medianas y valores extremos.

Resultados. Se estudió a 52 individuos, 38 (73,1%) mujeres, con una mediana de edad de 40 años (16-75 años). Se verificó que la mayor parte de los pacientes tenía lesión única (34 casos, 65,4%); la mediana del diámetro de las lesiones fue de 12 cm y en 35 (67,3%) pacientes se verificaron comunicaciones biliares. Se observó una negativización progresiva de ELISA-IgE y de ELISA-IgG, hasta alcanzar el 98 y el 84% al cuarto año de seguimiento, respectivamente. Se detectó un comportamiento errático de ELISA-IgG, con viraje de negativo a positivo en un 11% de los casos, en ausencia de imágenes quísticas radiológicas o ecotomográficas en el tórax y el abdomen.

Conclusiones. Se constató un alto porcentaje de negativización de ELISA-IgE. Se observó un comportamiento errático de ELISA-IgG de difícil interpretación.

Palabras clave: Hidatidosis hepática. Pruebas inmunológicas. ELISA. IgE. IgG. Estudios de seguimiento.

PRECISION OF ELISA-IGE AND ELISA-IGG DETERMINATION IN THE POSTOPERATIVE FOLLOW-UP OF PATIENTS WITH HEPATIC ECHINOCOCCOSIS

Introduction. Follow-up of patients undergoing surgery for hepatic echinococcosis (HE) is essential to ensure the absence of infection. The aim of this study was to determine the behavior over time of specific IgG and IgE to *Echinococcus granulosus* determined by the ELISA technique (ELISA-IgG and ELISA-IgE) in patients undergoing surgery for HE.

Material and method. We performed a concurrent cohort study of patients who underwent surgery for HE between 1994 and 2003 in the Regional Hospital of Temuco, Chile. Non-probabilistic convenience sampling was performed in patients with a minimum follow-up of 48 months and annual qualitative determinations of ELISA-IgE and ELISA-IgG. Descriptive statistics were applied, with calculation of percentages, medians, and extreme values.

Results. Fifty-two patients were studied, of whom 38 (73.1%) were women. The median age was 40 years (16 to 75 years). Most of the patients had a single cyst (34 patients, 65.4%); the median cystic diameter was 12 cm. In 35 (67.3%) patients, biliary communications were found. Progressive negativization of ELISA-IgE and ELISA-IgG was observed, reaching 98% and 84% in the fourth year of follow-up respectively. Erratic behavior of ELISA-IgG was detected, with a change from negative to positive in 11% of the patients, none of whom had radiological or ultrasonographic evidence of cysts in the thorax or abdomen.

Correspondencia: Dr. C. Manterola.
Departamento de Cirugía. Universidad de La Frontera.
Casilla 54-D. Temuco. Chile.
Correo electrónico: cmantero@ufro.cl

Conclusions. A high percentage of negativization of ELISA-IgE was observed. The erratic behavior of ELISA-IgG is difficult to interpret.

Key words: *Hepatic echinococcosis. Immunologic tests. Enzyme-linked immunosorbent assay. IgE. IgG. Follow-up studies.*

Introducción

La recurrencia de hidatidosis hepática (HH) después de la aplicación de diferentes tratamientos alcanza cifras de hasta un 19,4%¹⁻⁴, por lo que el seguimiento de los pacientes tratados por HH es fundamental. Éste se puede realizar mediante controles clínicos, técnicas de imagen y de inmunodiagnóstico (ID)⁵, métodos estos últimos, válidos y confiables para la detección de anticuerpos anti *Echinococcus granulosus*⁶.

El diagnóstico temprano de una recurrencia puede representar una mejoría considerable en el tratamiento y el pronóstico. Lamentablemente, en la mayoría de los casos, las etapas tempranas de la reinfección, así como de la infección, son asintomáticas, lo que significa que la única forma de acceder a un diagnóstico oportuno es mediante la aplicación de un tamizado o cribado riguroso, a través del tiempo, de las personas que se han tratado de HH.

Para realizar un cribado en este tipo de situaciones, contamos con diversas técnicas de ID, entre las que destacan las determinaciones por inmunoprecipitación DD₅ o arco 5.º de Capron, inmunoanálisis como ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) inmunoglobulina (Ig) E, y ELISA-IgG, pruebas de hemaglutinación y la inmunoelectrotransferencia o Western blott⁵⁻⁸.

Sin embargo, el hecho de que la respuesta inmunológica en la hidatidosis sea muy variable, comporta que los resultados obtenidos con ID dependan de una serie de factores, como la técnica de laboratorio utilizada, el estado evolutivo del o los quistes, su localización, el número, etc.⁵. Esto significa que todas las técnicas de ID disponibles en la actualidad se caracterizan por una precisión imperfecta, con sensibilidades, especificidades y porcentajes de clasificación correcta que en términos generales no superan el 90%^{7,8}. De este modo se entiende que una prueba inmunológica ideal es la que permite detectar con una alta probabilidad de clasificación correcta nuevos casos y recidivas eventuales después de un tratamiento médico o quirúrgico⁹.

El objetivo de este trabajo ha sido determinar mediante la técnica de ELISA el comportamiento en el tiempo de los valores de IgG e IgE específicas para *E. granulosus* en individuos intervenidos quirúrgicamente por HH.

Material y método

Diseño

Cohorte concurrente.

Población

Individuos intervenidos quirúrgicamente por HH por el primer autor en el Servicio de Cirugía del Hospital Regional de Temuco (Chile). Se consideró para el estudio a pacientes operados tanto de forma electiva como de urgencia, independiente del número de quistes, tamaño, localización y existencia de complicaciones evolutivas de la enfermedad. Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia de los pacientes con un seguimiento mínimo de 48 meses y que contase con al menos una determinación anual de ELISA-IgE y ELISA-IgG. Se excluyó a pacientes con: hidatidosis en otra localización, otras lesiones quísticas abdominales, enfermedades hepáticas crónicas o insuficiencia orgánica concomitante.

Protocolo de estudio

Los pacientes que participaron en el estudio forman parte de una cohorte de individuos intervenidos por hidatidosis abdominal a partir de 1995, que cumplen con un protocolo de seguimiento que contempla controles clínicos, bioquímicos, serológicos (ELISA-IgE y ELISA-IgG) y de imagen a los 12, 24, 36, 48 y 60 meses de la intervención quirúrgica¹⁰. Se tuvo en cuenta el tiempo cero o basal de cada medición, el momento en que se practicó la cirugía y, por lo tanto, el estándar de referencia para la confirmación diagnóstica de la enfermedad fue el estudio de anatomía patológica de los especímenes quirúrgicos^{7,8}.

Diagnóstico serológico

Las muestras se procesaron en el laboratorio de inmunología del Hospital Regional de Temuco y las determinaciones ulteriores se realizaron del modo siguiente:

– Para la determinación de ELISA-IgE, se utilizó como reactivo Rabbit anti-human IgE, diluido en amortiguador fosfato salino (PBS) (3 l de conjugado + 100 l de PBS), que se incubó a 4 °C durante 12 h. Se bloqueó la placa con PBS/suero albúmina de bovino (SAB) al 2% (PBS + SAB al 2%) durante 1 h a temperatura ambiente. Se diluyó las muestras con PBS/Tween al 0,05% en proporción de 1:1 (p. ej., 100 ul de suero + 100 ul de PBS/Tween al 0,05%). Se eliminó por centrifugado la solución PBS/SAB al 2% de la placa, y se agregaron 100 l de las muestras y controles diluidos, lo que se incubó durante 3 h a una temperatura de 37 °C. Se lavó la placa 5 veces con PBS/Tween al 0,05%. Se preparó el conjugado con 1 l de IgE + 1 ml de PBS/Tween al 0,05%, que se incubó durante 1,5 h a una temperatura de 37 °C. Se lavó la placa 5 veces con PBS/Tween al 0,05%. Se agregaron 100 l de sustrato (TMB-DAKO) y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 100 l de H₂SO₄ al 1 normal. Finalmente, se leyó la coloración en un lector de ELISA a 450 nm.

– Para la determinación de ELISA-IgG, se preparó el antígeno IgG en una *buffer coating* (para 100 ml de amortiguador se mezclaron 0,159 g de Na₂CO₃ + 0,293 g de NaHCO₃ + 0,020 g de ázida sódica, además se agregaron 100 ml de agua destilada) y luego se pegó en placas de poliestireno. Se mezclaron cuidadosamente los 100 ml de *buffer coating* más una porción de IgG hidatídico; se colocaron 100 l en cada pocillo de la placa y se incubaron durante 12 h a una temperatura de 4 °C. Luego se bloqueó con PBS/SAB al 2% durante 1 h a temperatura ambiente y se eliminó por centrifugado. Una vez descongelada la placa, ésta se lavó y las muestras se diluyeron con PBS/Tween al 0,05% en 1:200. Posteriormente, 100 l de muestra diluida se incubó durante 1 h a una temperatura de 37 °C y luego se lavó 5 veces con PBS/Tween al 0,05%. El conjugado se preparó con 5 l de anti-human IgG de cabra + 2,5 ml de PBS/Tween al 0,05%. Posteriormente se agregaron 100 l de conjugado, que se incubó a 37 °C durante 1 h. Luego, se lavó 5 veces con PBS/Tween al 0,05% y se agregaron 100 l del sustrato TMB-DAKO (3,3', 5,5' –tetramethylbenzidina + peroxidasa diluido en una solución de amortiguador–) durante 10 min a temperatura ambiente y se detuvo la reacción con 100 l de H₂SO₄ al 1 normal. Finalmente, se efectuó la lectura de la placa en un lector de ELISA a 450 nm.

– Se consideraron positivas todas las muestras cuya lectura fuera igual o superior al punto de corte; éste se obtiene con la ecuación VC = Cneg N.º 1 + Cneg N.º 2 + 0,1 (VC: punto de corte; Cneg N.º 1: control negativo N.º 1; Cneg N.º 2: control negativo N.º 2)¹¹.

Plan de análisis

Se realizó un análisis exploratorio de los datos y se aplicó estadística descriptiva con cálculo de porcentajes, medianas y valores extremos.

Resultados

Se estudió a 52 individuos, 38 (73,1%) mujeres y 14 (26,9%) varones, con una mediana de edad de 40 años (16-75 años).

Dieciséis (30,8%) pacientes habían desarrollado alguna complicación evolutiva de la enfermedad. Se verificó que la mayor parte de los pacientes tenía lesión única (34 casos, 65,4%); la mediana del diámetro de las lesiones fue de 12 cm (5-30 cm) y en 35 (67,3%) pacientes se verificaron comunicaciones biliares.

Se practicó quistectomía subtotal en 35 pacientes (67,3%), lobectomía en 9 pacientes (17,3%) y periquistectomía en 8 pacientes (15,4%). Con una mediana de seguimiento de 76 meses (49-125 meses) se constató una morbilidad de 13,4%. En la serie en evaluación no se verificó mortalidad ni recurrencia de la enfermedad.

Respecto al comportamiento de las determinaciones de ELISA-IgG y ELISA-IgE, se lograron evidenciar los hechos siguientes:

1. En el caso de ELISA-IgE, se observó una negativización progresiva, que se verificó en el 78% de los casos a partir del primer año, hasta superar el 98% al cuarto año de seguimiento (fig. 1).

2. Respecto a ELISA-IgG, se verificó un comportamiento de negativización de tendencia más lenta, que comenzó a manifestarse al primer año en el 21% de los casos, para superar el 84% al cuarto año de seguimiento (fig. 1). Sin embargo, se constató positivización a partir del segundo año de seguimiento en algunos pacientes que en su determinación anterior habían sido negativos (casos en los que al repetir la medición se volvió a obte-

ner un resultado positivo). En este sentido, se comprobó que un 11,5% de los pacientes (6 casos) cambió de negativo a positivo en ausencia de imágenes quísticas radiológicas o ecotomográficas en el tórax y abdomen. En la mitad de estos casos, las mediciones posteriores siguieron siendo positivas, sin una explicación plausible del fenómeno.

Discusión

Se ha informado acerca de cifras de sensibilidad y especificidad para ELISA-IgG de 81,6 a 100% y 95%, respectivamente¹²⁻¹⁴. Además, en un estudio recientemente publicado por nuestro grupo de trabajo, verificamos una sensibilidad y especificidad del 83 y del 87%, respectivamente, en nuestros pacientes⁸, en los que además observamos que ELISA-IgG tenía mayor rendimiento cuando había 2 o más quistes (el 90 frente a el 77% en individuos con quiste único); cuando los quistes eran de un diámetro superior a 15 cm (el 85 frente al 80% en pacientes con quistes de menos de 15 cm de diámetro), y en pacientes con quistes multivesiculares comparado con univesiculares (el 88 frente al 80%)⁸.

Force et al¹⁵ estudiaron varios métodos y buscaron el que permitiera llevar a cabo un seguimiento de los pacientes. Encontraron que el mayor problema que plantean los distintos métodos diagnósticos es el tiempo que tardan en negativizarse, hecho ya sugerido por Orduña et al¹⁶.

Cuando la IgE disminuye tras la cirugía indica buen pronóstico^{5,17}, y se asocia un aumento de ésta a una progresión de la enfermedad. Pero esta disminución suele observarse a partir de los 6 meses, y en algunos casos puede llegar a varios años. Otro inconveniente de la IgE es su falta de especificidad, ya que aparece elevada en otras parasitosis distintas de la hidatidosis y en otro tipo de procesos no infecciosos, como cirrosis hepática y enfermedades malignas¹⁷.

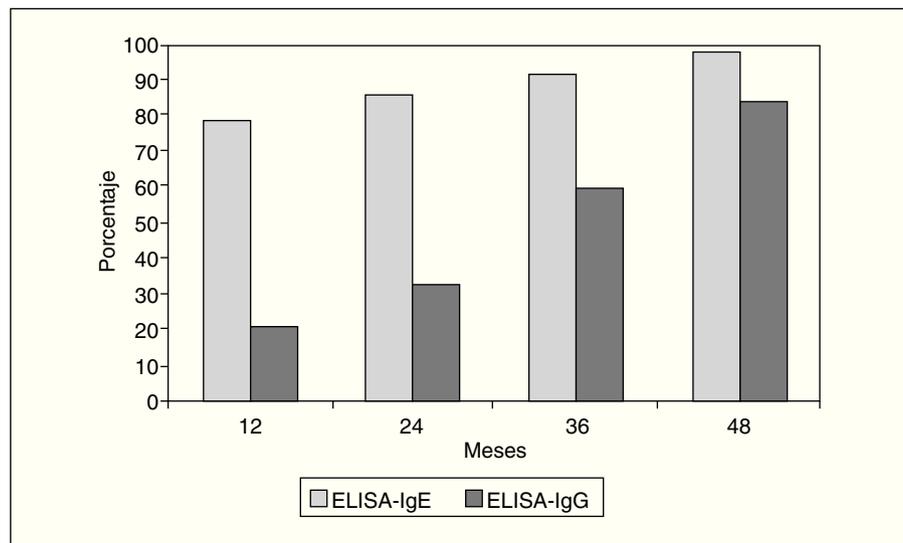


Fig. 1. Comportamiento en el transcurso del tiempo de ELISA-IgE y ELISA-IgG en pacientes intervenidos quirúrgicamente por hidatidosis hepática. Se aprecia una negativización progresiva a medida que transcurren los controles, la cual se hace más evidente para ELISA-IgE, que supera el 98% al cuarto año de seguimiento frente a ELISA-IgG, que presentó una negativización más lenta y que sólo llegó a superar el 84% al cuarto año de seguimiento.

La determinación de anticuerpos totales IgG parece bastante útil, ya que resulta sensible y específica. Sin embargo, en el ámbito del seguimiento de pacientes intervenidos quirúrgicamente, esto no parece ser así, dado el lento proceso de negativización y los resultados erráticos descritos (cambio de negativo a positivo y en algunos casos nuevamente de positivo a negativo); situaciones de difícil explicación que podrían derivarse de reacciones cruzadas con otras parasitosis, especialmente por otros cestodos taenidos, como *Echinococcus multilocularis* y *Taenia solium*^{5,18}. Por estas razones, algunos grupos han desarrollado algunas estrategias de laboratorio que han permitido avanzar en este ámbito, y es así como se ha determinado que algunas subclases de las inmunoglobulinas de tipo IgG podrían proporcionar información de mayor utilidad, en especial la subclase IgG₁, de la que se ha informado que alcanza una gran sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de HH, con la disminución de su sensibilidad y especificidad en la hidatidosis extrahepática⁵. Por su parte, la subclase IgG₄ también aparece en otras parasitosis de larga duración, como equistosomiasis, filariasis y estrongiloidiasis crónica¹⁹, ya que la síntesis de IgG₄ por los leucocitos de sangre periférica depende de la producción de interleucinas (IL)^{20,21}. De este modo, Rigano et al²² propusieron a la IL-4 para el seguimiento de este tipo de pacientes y han encontrado que los que responden al tratamiento producen significativamente menos IL-4 que los que no responden (esto implica una menor producción de IgG₄ y una menor producción de IgG). En otro estudio, Navarro-Zorraquino et al²³ siguieron la evolución de pacientes con HH e hidatidosis pulmonar tras la cirugía, con la medición de los valores de IL-4, y encontraron resultados similares. La exposición antigénica continua a la que se encuentran sometidos los pacientes infectados por *E. granulosus* implica que la producción de IL-4 sea elevada y, por tanto, la IgG₄ alcance valores mayores. Cuando el quiste desaparece o se calcifica, la producción de antígenos parasitarios desciende hasta valores indetectables, no hay producción de IL-4 y la IgG₄ disminuye hasta valores negativos. En otro estudio, Ravinder et al⁶ midieron los valores de antígenos en suero de pacientes afectados y encontraron que tras someterlos a intervenciones quirúrgicas, las concentraciones de antígenos circulantes descendían gradualmente a partir del séptimo día, y desaparecían después del primer mes de la intervención y del sexto mes de tratamiento farmacológico (la subclase IgG₄ se negativizaría si la evolución fuera favorable, se positivizaría en pacientes asintomáticos si éstos presentaran recaídas, y se mantendría constante si la cirugía no hubiera sido completa). Guerri et al²⁴ demostraron que en los pacientes a los que se extirpó con éxito la lesión hidatídica, la subclase de IgG₄ se negativizó tempranamente, a diferencia de los pacientes en los que se produce recidiva de la enfermedad, en los cuales se ha verificado que los títulos de IgG₄ se mantienen elevados^{21,25,26}. Por las consideraciones antes expuestas, parece razonable sostener que la IgG₄ podría ser un marcador efectivo para llevar a cabo un seguimiento de pacientes con HH, y que, junto a la subclase IgG₁, podría ser útil en el diagnóstico de esta afección, pero tendrían el inconveniente de su escasa disponibilidad en el mercado.

Otros grupos han ensayado protocolos de seguimiento a partir de la realización de determinaciones con ELISA-IgE y ELISA-IgM específicas^{22,25,26}, así como con la combinación de determinaciones IL-4 y de determinación de la expresión en el ARNm de citocinas mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa²⁷, con lo que se obtienen resultados aceptables que sugieren que la detección de antígenos circulantes también es relevante como método de seguimiento posquirúrgico y de control de las dinámicas de crecimiento y/o la actividad de los quistes^{5,21,28}.

En conclusión, se constató un alto porcentaje de negativización de ELISA-IgE a corto plazo, aún cuando el 100% de ésta no se alcanzó en el tiempo estudiado. Se observó un comportamiento errático de ELISA-IgG, difícil de interpretar, que podría corresponder a falsos positivos.

Bibliografía

1. Turkylmaz Z, Sonmez K, Karabulut R, Demirogullari B, Gol H, Baksaklar AC, et al. Conservative surgery for treatment of hydatid cysts in children. *World J Surg*. 2004;28:597-601.
2. Schipper HG, Kager PA. Diagnosis and treatment of hepatic echinococcosis: an overview. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 2004;241:50-5.
3. Atmatzidis KS, Pavlidis TE, Papaziogas BT, Mirelis C, Papaziogas TB. Recurrence and long-term outcome after open cystectomy with omentoplasty for hepatic hydatid disease in an endemic area. *Acta Chir Belg*. 2005;105:198-202.
4. Smego RA Jr, Sebanego P. Treatment options for hepatic cystic echinococcosis. *Int J Infect Dis*. 2005;9:69-76.
5. Lightowler MW, Gottstein B. Echinococcosis/hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis. En: Thompson RCA, Lymbbery AJ, editors. *The biology of Echinococcus and hydatid disease*. Wallingford: CAB International; 1995. p. 355-410.
6. Ravinder PT, Parija SC, Rao KS. Evaluation of human hydatid disease before and after surgery and chemotherapy by demonstration of hydatid antigens and antibodies in serum. *J Med Microbiol*. 1997;46:856-64.
7. Manterola C, Cuadra A, Fonseca F, Bustos L, Hinostrza J. Utilidad de DD5 y ELISA IgG como pruebas diagnósticas específicas en pacientes con hidatidosis hepática. *Rev Chil Cir*. 2003;55:25-9.
8. Manterola C, Cuadra A, Munoz S, Sanhueza A, Bustos L, Vial M, et al. In a diagnostic test study the validity of three serodiagnostic test was compared in patients with liver echinococcosis. *J Clin Epidemiol*. 2005;58:401-6.
9. Zhanqing SH, Xinhua F, Zhongxi Q, Ruilin L, Chunrong Y. Application of biotin-avidin system, determination of circulating immune complexes, and evaluation of antibody response in different hydatids patients. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;36:93-6.
10. Manterola C, Molina E, Fernández O, Barroso M. Quistectomía subtotal. Una alternativa quirúrgica racional en el tratamiento de la hidatidosis hepática. *Rev Chil Cir*. 1998;50:621-9.
11. Grimm F, Maly FE, Lu J, Llano R. Analysis of specific immunoglobulin G subclass antibodies for serological diagnosis of Echinococcosis by a standard enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998;5:613-6.
12. Gutiérrez R, Hinostrza J, Díaz P, Fierro J, Pineda J, Henríquez MI. Inmunología pre y postoperatoria en hidatidosis. *Rev Med Sur*. 1991;16:18-21.
13. Lorca M, Escalante H, García A, Denegri M, Sierra P, Silva M. Estandarización y evaluación de una técnica de ELISA para el diagnóstico de la hidatidosis humana. *Parasitol Día*. 1991;15:74-8.
14. Gadea I, García de Lomas J. Serología de la hidatidosis. *Enferm Infect y Microbiol Clin*. 1991;4:237-47.
15. Force L, Josep M, Alfonso C. Evaluation of eight serological test in the diagnosis of human echinococcosis and follow up. *Clin Infect Dis*. 1992;15:473-80.

16. Orduña A, Espinosa M, Bratos M, Rodríguez A. Estudio de la evolución serológica posquirúrgica en pacientes con hidatidosis mediante pruebas clásicas y pruebas ELISA. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1986;4:213-20.
17. Corachán M. Enfermedades producidas por helmintos. En: Farreras y Rozman, editores. *Medicina Interna.* Barcelona: 1992. p. 2397-405.
18. Poretti D, Felleisen E, Grimm F, Pfister M, Teuscher F, Zuercher C, et al. Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60:193-8.
19. Schantz PM. Parasitic zoonoses in perspective. *Int J Parasitol.* 1991;321:161-70.
20. Younes S, Dirk J, Osuna A. Serologic recognition of hydatid cyst antigens using different methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1996;24: 205-11.
21. Zhang W, Li J, McManus DP. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16:18-36.
22. Rigano R, Profumo E, Ioppolo S, Notargiacomo S, Ortona E, Teggi A, et al. Immunological markers indicating the effectiveness of pharmacological treatment in human hydatid disease. *Clin Exp Immunol.* 1995;102:281-5.
23. Navaro-Zorraquino M, Larrad L, Lozano R, Sainz M, Roman J. Cellular and humoral immunological response in hydatid patients undergoing surgery. *Arch Hidatidosis.* 1999;30:401-10.
24. Guerri ML, Davila M, Rodríguez M, Javier Nieto F, Ladron de Guevara C. Utility of IgG subclasses in the diagnosis and follow up of hydatidosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2000;18:262-6.
25. Rigano R, Profumo E, Teggi A, Siracusano A. Production of IL-5 and IL-6 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with *Echinococcus granulosus* infection. *Clin Exp Immunol.* 1996;105:456-9.
26. Zarzosa MP, Orduna Domingo A, Gutierrez P, Alonso P, Cuervo M, Prado A, et al. Evaluation of six serological tests in diagnosis and postoperative control of pulmonary hydatid disease patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999;35:255-62.
27. Rigano R, Profumo E, Buttari B, Teggi A, Siracusano A. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pharmacologically treated cystic echinococcosis. *Clin Exp Immunol.* 1999;118:95-101.
28. Ferragut G, Ljungstrom I, Nieto A. Relevance of circulating antigen detection to follow-up experimental and human cystic hydatid infections. *Parasite Immunol.* 1998;20:541-9.