

Métodos para diagnóstico hidatidose

Avaliação de dois métodos laboratoriais para diagnóstico de hidatidose

Generosa Batista¹, Zúzeza Magalhães², Renato Abreu³, Elisa Caria⁴, Ana Almeida³

1. Serviço de Patologia Clínica, Hospital do Espírito Santo de Évora, EPE.

2. Serviço de Imunohemoterapia, Hospital de Egas Moniz, Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, EPE.

3. Área Científica de Análises Clínicas e Saúde Pública, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. ana.almeida@estesl.ipl.pt

4. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa.

RESUMO: A hidatidose, vulgarmente conhecida por quisto hidático, é causada pelos estados larvares do parasita *Echinococcus granulosus*. O seu diagnóstico baseia-se na clínica, na epidemiologia e nas técnicas imagiológicas, sendo suportado por testes serológicos. O tratamento mais comum é o cirúrgico, sendo importante o diagnóstico definitivo da doença antes da cirurgia, para se prevenir a disseminação dos quistos que pode ocorrer durante a mesma. Neste trabalho comparam-se dois métodos imunoserológicos para o diagnóstico da hidatidose: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) para pesquisa de Imunoglobulina G; e *Fluoro-enzyme Immunoassay* (FEIA) para pesquisa de Imunoglobulina E. Dos 55 indivíduos incluídos no estudo, todos em fase pré-operatória, 31% possuíam quisto hidático calcificado, 54,5% quisto hidático não calcificado e 14,5% não possuíam hidatidose, mas quistos simples. Os testes apresentaram a mesma especificidade (87,5%), sendo a sensibilidade do ELISA IgG mais baixa (63,8%) do que a do FEIA IgE (76,6%). Foi demonstrada uma boa correlação entre os dois métodos ($r = 0,726$, $p < 0,05$).

Palavras-chave: *Echinococcus granulosus*, hidatidose, ELISA, FEIA

Evaluation of two laboratory methods for the diagnosis of hydatidosis

ABSTRACT: Hydatidosis, also known as hydatid cyst, is caused by the larval stages of the parasite *Echinococcus granulosus*. Its diagnostic relies mainly on clinical findings, epidemiology and imaging techniques supported by serological tests. Surgery is the commonest treatment; it is important to have a definitive diagnostic of hydatidosis before surgery, to avoid the spread of the cysts during the procedure.

In this study, two immunoserologic tests for the diagnostic of hydatidosis are compared: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) for immunoglobulin G; and *Fluoro-Enzyme Immunoassay* (FEIA) for immunoglobulin E. The 55 patients included in this study are in a pre surgery stage, 31% have a calcified hydatid cyst, 54,5% a not calcified cyst and 14.5% have no hydatid cyst. Both tests had the same specificity (87.5%), the sensitivity of the ELISA IgG was lower (63.8%) then the FEIA IgE (76.6%). The correlation observed between of both tests was good ($r = 0.726$, $p < 0.05$).

Keywords: *Echinococcus granulosus*, Hydatidosis, ELISA, FEIA

Introdução

A hidatidose é uma antropozoonose que, devido a factores como a variabilidade individual da resposta imunológica do hospedeiro, a localização e o estado de desenvolvimento do quisto hidático e a preparação laboratorial do antigénio, coloca com frequência problemas quanto ao seu diagnóstico.

Esta parasitose é causada pelos estados larvares dos céstodos do género *Echinococcus*. A espécie de maior importância na

Península Ibérica é o *Echinococcus granulosus*, que parasita habitualmente o cão doméstico em zonas de criação de ovinos. A região mais endémica da Europa situa-se em Portugal, no Alandroal¹⁻³. Em Portugal, a hidatidose é uma doença de notificação obrigatória (Portaria n.º 766/86, de 26 de Dezembro).

Na fase adulta, os *Echinococcus* são tenídeos de pequenas dimensões que vivem em grande número no intestino de diversos canídeos e alguns felídeos. O *Echinococcus*

granulosus apresenta três fases evolutivas: verme adulto, ovo ou oncosfera e larva hidática (quisto hidático). As ovelhas são os hospedeiros intermediários naturais do *Echinococcus granulosus*, albergando as formas larvares, representadas por estruturas vesiculares, as hidátides⁴.

No homem, a infecção por *Echinococcus granulosus* só ocorre na fase larvar do parasita. A parasitose é acidental e mantém-se silenciosa durante anos até que os quistos causem sintomas nos órgãos afectados. Estes são preferencialmente o fígado e os pulmões, mas a disseminação hematogénica pode transportar os quistos a qualquer localização anatómica⁴.

Apesar de terem sido sugeridas várias vias de contágio humano, actualmente a única via admitida é a via digestiva, permanecendo apenas em aberto o trajecto circulatório predominante (venoso ou linfático), segundo a localização dos quistos².

O diagnóstico da hidatidose baseia-se em técnicas imagiológicas e é suportado por testes serológicos positivos. Pacientes com testes serológicos negativos e com resultados imagiológicos compatíveis com hidatidose devem ser sujeitos a biópsia para diagnóstico, durante a qual devem ser tomadas precauções para controlar a reacção alérgica e evitar a disseminação do líquido hidático e dos seus elementos figurados⁵. O diagnóstico serológico pré-operatório reveste-se de grande importância na monitorização pós-operatória, sendo utilizado como ponto zero, permitindo avaliar a evolução imunológica do doente, de forma a avaliar os resultados da cirurgia e clarificar o prognóstico⁵.

O tratamento mais comum para a hidatidose é cirúrgico, embora, geralmente, a remoção da massa do parasita não seja 100% efectiva. Em alguns casos pode optar-se por quimioterapia com albendazol e/ou mebendazol⁴.

A prevenção da hidatidose deve ter início no controlo da infecção canina, sendo este o elo mais fraco da cadeia epidemiológica. Os cães não devem consumir carne ou vísceras cruas. A educação sanitária da população tem um papel importante na prevenção da infecção humana. A população deve ser alertada para os perigos da doença, o seu meio de transmissão e o tipo de atitude que se deve ter em relação aos cães em zonas endémicas⁴.

Com o presente trabalho pretende comparar-se a sensibilidade e especificidade dos dois métodos analíticos: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) para pesquisa de imunoglobulina G (IgG) espécie-específica e *Fluoro-enzyme Immunoassay* (FEIA) para pesquisa de imunoglobulina E (IgE) espécie-específica. Pretende ainda fazer-se a validação destes dois métodos através de informação clínica.

A informação clínica é utilizada neste estudo como referência para validação dos resultados, já que o diagnóstico da hidatidose se baseia na clínica, epidemiologia e imagiologia. Isto porque podem ocorrer quistos calcificados, quiescentes ou mortos em alguns doentes que não produzem resposta imunológica, originando resultados serológicos falsos negativos⁴.

Pela avaliação destes dois métodos pretende perceber-se o tipo de associação existente entre ambos e qual destes o mais adequado ao diagnóstico laboratorial da hidatidose

de forma a avaliar a possibilidade de utilizar apenas um dos métodos no rastreio do diagnóstico da hidatidose, diminuindo assim os custos relacionados.

Material e Métodos

Fizeram parte do estudo indivíduos oriundos do Sul de Portugal, doentes da Consulta de Hidatologia, de 2000 a 2004, de um Hospital Distrital situado numa zona endémica, num total de 200 indivíduos, dos quais foram incluídos no estudo 55 indivíduos (de ambos os sexos).

Os indivíduos foram seleccionados de forma não probabilística e por conveniência, de forma a avaliar a resposta das duas variáveis na população da Consulta de Hidatologia.

Para elaboração do estudo foram considerados como critérios de inclusão: a realização de ELISA e FEIA, em simultâneo, para diagnóstico de hidatidose em fase pré-operatória e informação clínica clara e conclusiva.

De cada indivíduo foi recolhida uma amostra de sangue para tubo sem anticoagulante que, posteriormente, foi centrifugada a 3000 rpm durante 20 minutos. Do soro obtido foram separadas duas alíquotas, sendo uma processada no laboratório do Hospital e a outra enviada para Laboratório de referência onde se realizaram os testes de ELISA.

Fluoro-enzyme Immunosorbent Assay (FEIA)

Para a determinação da IgE espécie-específica para *Echinococcus* foi utilizado o Autoanalisador ImmunoCap®100 (Phadia AB). O princípio do teste baseia-se na reacção do soro com uma fase sólida (o *ImmunoCAP*), à qual está ligada covalentemente o alergénio (proteína P2) em estudo. A proteína P2 é idêntica à ciclofilina do *Echinococcus granulosus* que tem actividade de peptidil-prolil isomerase e que não origina reacções cruzadas com as ciclofilinas de outros organismos⁶. Após a incubação, é adicionado o conjugado IgE específico – β -galactosidase anti-IgE. O complexo formado é incubado com uma solução de desenvolvimento (4-metilumbeliferil – β -D-galactosidase 0,01%). A fluorescência é lida depois da paragem da reacção por adição de carbonato de sódio a 4%. A fluorescência do eluído é comparada com a curva de calibração efectuada com calibradores específicos. A fluorescência é directamente proporcional à concentração de IgE específica da amostra.

O FEIA detecta anticorpos IgE específicos no soro entre 0,35–100 KuA/L.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

A determinação da IgG espécie-específica para *Echinococcus* foi realizada em microplaca por método manual e a leitura dos resultados foi realizada espectrofotometricamente. O antigénio utilizado é o antigénio B (AgB) extraído de líquido hidático⁷. O AgB é uma lipoproteína polimérica presente nas formas larvares do parasita⁸. As proteínas da resposta imunitária específica ao parasita fixam-se ao antigénio B adsorvido nos poços de microplacas. O complexo formado é colocado em contacto com uma anti-IgG humana marcada com peroxidase. O cromogénio

é composto por ortofenilenodiamina (OPD) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2). A cor da solução final é directamente proporcional ao logaritmo da concentração dos anticorpos presentes no soro ensaiado, a leitura é expressa em densidades ópticas (DO). A curva de calibração é efectuada em cada ensaio, a partir de 9 diluições de um controlo constituído por uma *pool* de soros humanos positivos.

Os resultados obtidos pelo método ELISA são expressos em valores de densidade óptica, sendo interpretados como negativos ou positivos em função do *cut-off* do método de ELISA, que é 0,1 DO.

Neste estudo para a avaliação dos testes de diagnóstico recorreu-se à sensibilidade e especificidade como índices de avaliação. Efectuou-se também uma análise bivariada, para avaliar as relações entre as variáveis (Coeficiente de Correlação de Spearman). O programa de análise estatística utilizado foi o SPSS, versão 10.0.

Resultados e Discussão

Dos 55 indivíduos incluídos neste estudo, 47 são doentes com hidatidose clinicamente confirmada, os restantes 8 indivíduos apresentam quistos simples não hidáticos, tendo sido enviados à Consulta de Hidatologia para despiste da doença.

Dos 55 indivíduos, 17 (31%) têm quisto hidático calcificado, 30 (54,5%) têm quisto hidático não calcificado e 8 (14,5%) não possuem hidatidose mas quistos simples.

Os resultados pelo método FEIA foram os observados na Tabela 1 e os relativos ao método de ELISA encontram-se na Tabela 2.

A prevalência da doença na amostra estudada é elevada, 85,4%, situação que se justifica pelo facto de os dados terem sido recolhidos em processos de uma Consulta de Hidatologia, praticada em Hospital situado numa zona endémica.

Os resultados obtidos referentes à sensibilidade, à especificidade, à proporção de falsos positivos e falsos negativos, aos valores preditivos positivo e negativo e à eficiência global do teste encontram-se na Tabela 3.

A percentagem de resultados falsos negativos obtidos com o teste ELISA é de 36,1%, sendo superior à percentagem de falsos negativos obtidos com o teste FEIA, que foi de 23,4%. Aparentemente, a probabilidade de um indivíduo ter um teste negativo sendo doente, ou seja, a percentagem de resultados negativos do grupo de doentes parece ser elevada, mas deve ser referido que o quisto hidático pode calcificar ou mesmo tornar-se inviável, não estimulando resposta imune no seu portador². Tal facto é observável estatisticamente neste estudo, já que nos 11 casos falsos negativos para o FEIA 9, ou seja, 81,8% dos casos, correspondem a quistos calcificados; e, dos 17 casos falsos negativos para o ELISA, 10, ou seja, 58,8% dos casos, reportam-se também a quistos calcificados.

Dezassete indivíduos dos 55 estudados possuíam quisto calcificado. No entanto, foi possível diagnosticar laboratorialmente, pelo método FEIA, 7 desses doentes (41,2%), enquanto que, com o método ELISA, se diagnosticaram apenas 3 desses casos (17,6%).

Tabela 1: Tabela de contingência – FEIA versus hidatidose.

		Hidatidose		Total
		Presente	Ausente	
FEIA	Positivo	36	1	37
	Negativo	11	7	18
Total		47	8	55

Tabela 2: Tabela de contingência – ELISA versus hidatidose.

		Hidatidose		Total
		Presente	Ausente	
ELISA	Positivo	30	1	31
	Negativo	17	7	24
Total		47	8	55

Tabela 3: Avaliação global dos métodos de FEIA e de ELISA.

	FEIA	ELISA
Sensibilidade	76,6%	63,8%
Especificidade	87,5%	87,5%
Proporção de falsos positivos	12,5%	12,5%
Proporção de falsos negativos	23,4%	36,2%
Valor preditivo positivo	97,2%	96,7%
Valor preditivo negativo	38,8%	29,1%
Eficiência global do teste	78,1%	67,2%

A eficácia global do método FEIA é superior à do método ELISA, sendo de 78,1% contra 67,2%, respectivamente, o que significa que identificou correctamente um maior número de casos.

Para confirmação das distribuições apresentadas pelos dados tratados pelo método de FEIA e de ELISA, foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,05$), o qual confirma que as distribuições não seguem a normalidade, sendo necessário recorrer ao Coeficiente de Correlação de Spearman para avaliar a força de associação entre os dois métodos. Através do Coeficiente de Correlação de Spearman verificámos que a associação entre as duas variáveis é boa, logo não é aconselhável afirmar que uma das técnicas é mais adequada que a outra para o diagnóstico laboratorial da hidatidose.

Embora a sensibilidade do método FEIA apresente um valor mais elevado que o método ELISA, quando se realiza o Coeficiente de Correlação de Spearman para determinar o tipo de associação entre os dois métodos, verifica-se que esta é boa ($r = 0,726$, $p < 0,05$), como já havia sido referido no estudo de Afferni⁹ ($r = 0,7$, $p < 0,01$). Neste estudo são comparadas a sensibilidade e especificidade dos testes ELISA e FEIA, tendo a sensibilidade sido idêntica para os dois testes (77%).

Num estudo de Sbihi¹⁰, a técnica ELISA específica para IgG

com utilização de antígeno B purificado apresentou uma sensibilidade de 96,5%, bastante superior à encontrada no presente estudo que foi de 63,8%. Esta diferença poderá estar relacionada com a diferença existente entre a amostra utilizada em cada um dos estudos.

Conclusão

Em relação às hipóteses colocadas podemos concluir que: Quanto à sensibilidade e à especificidade do método FEIA serem superiores às do método ELISA, verificamos que a sensibilidade do método FEIA (76,6%) é superior à do método ELISA (63,8%), mas a especificidade (87,5%) é igual para ambos os testes.

Quanto à existência de uma associação forte entre o método FEIA e ELISA, verificamos através do Coeficiente de Correlação de Spearman que esta é boa ($r = 0,726$, $p < 0,05$).

Verificou-se também que a percentagem de falsos negativos obtidos pelo método ELISA é superior à do método FEIA.

Assim, com este estudo, podemos concluir que se torna desnecessário utilizar ambos os métodos em simultâneo mas, para isso, é recomendável uma boa articulação entre a clínica e os laboratórios, por forma a veicularem informações que visem estabelecer normas para o acompanhamento laboratorial desta doença.

Tendo em consideração que o método FEIA é o que apresenta uma sensibilidade mais elevada, este deve ser utilizado preferencialmente para o diagnóstico laboratorial da hidatidose como teste de rastreio.

Referências bibliográficas

- David-Morais JA. Estudo epidemiológico da equinococose-hidatidose no distrito de Évora: problemática metodológica. Rev Port Doenç Infec. 1997;20(3):137-45. Portuguese
- David-Morais JA. A hidatidologia em Portugal. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1998. ISBN 9723108119
- David-Morais JA. Hidatidose humana: estudo clínico-epidemiológico no distrito de Évora durante um quarto de século [Human hydatidosis in the district of Évora, Portugal: a clinical-epidemiological study over a quarter of a century]. Acta Med Port. 2007;20:1-10. Portuguese
- Rey L. Bases da parasitologia médica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. ISBN 8527706938
- Biava MF, Dao A, Fortier B. Laboratory diagnosis of cystic hydatid disease. World J Surg. 2001 Jan;25(1):10-4.
- Ortona E, Vaccari S, Marquetti P, Delunardo F, Rigano R, Profumo E, et al. Immunological characterization of *Echinococcus granulosus* cyclophilin, an allergen reactive with IgE and IgG4 from patients with cystic echinococcosis. Clin Exp Immunol. 2002 Apr;128(1):124-30.
- Zhang W, Li J, McManus DP. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. Clin Microbiol Rev. 2003 Jan; 16(1):18-36.
- Carmena D, Martínez J, Benito A, Guisantes JA. Shared and non-shared antigens from three different extracts of the metacestode of *Echinococcus granulosus*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005 Dec;100(8):861-7.
- Afferri C, Pini C, Misiti-Dorello P, Bernardini L, Conchedda M, Vicari G. Detection of specific IgE antibodies in sera from patients with hydatidosis. Clin Exp Immunol. 1984 Mar;55(3):587-92.
- Sbihi Y, Rmiqui A, Rodriguez-Cabezas MN, Orduña A, Rodriguez-Torres A, Osuna A. Comparative sensitivity of six serological tests and diagnostic value of ELISA using purified antigen in hydatidosis. J Clin Lab Anal. 2001;15(1):14-8.

Agradecimentos

Agradecemos à Prof. Doutora Helena Ângelo e ao Prof. Doutor David Morais pelos conteúdos científicos facultados, enriquecendo desta forma o nosso estudo.

Artigo recebido em 10.10.2007 e aprovado em 25.05.2009.