

TRABAJOS CIENTÍFICOS

Utilidad de DD5 y ELISA-IgG como pruebas diagnósticas específicas en pacientes con hidatidosis hepática

*Drs. CARLOS MANTEROLA D, ALVARO CUADRA C, FLERY FONSECA S,
LUIS BUSTOS M, JAIME HINOSTROZA S*

*Servicio de Cirugía, Laboratorio Clínico, Hospital Regional de Temuco, Departamento de Cirugía,
Departamento de Ciencias Preclínicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera,
Capacitación, Investigación y Gestión para la Salud Basada en Evidencia (CIGES)*

RESUMEN

La confirmación diagnóstica preoperatoria de hidatidosis se ha basado en la determinación de antígenos parasitarios. Los más usados han sido DD5 y determinación de inmunoglobulina IgG (ELISA-IgG). El objetivo de este trabajo es determinar la eficacia de DD5 y ELISA-IgG utilizadas por separado y en paralelo, en pacientes con hidatidosis hepática (HH) y en forma secundaria, determinar reproductibilidad de la medición de ELISA-IgG por dos laboratorios independientes. Estudio de pruebas diagnósticas. Se aplicó DD5 e IgG a 75 pacientes con HH (casos) y 75 con coledolitiasis (controles). Se consideraron como estándares de referencia la cirugía (casos): ecotomografía abdominal y radiología de tórax (controles). El tamaño de la muestra para sensibilidad (S) fue calculado asumiendo un 99% de confianza (IC), S esperada de 90% y peor resultado de 80%; el tamaño de la muestra para especificidad (E), con 99% de IC, E esperada de 95% y peor resultado de 85%. Se calculó S, E, valores predictivos positivo y negativo (VPP y VPN) para cada prueba diagnóstica por separado y de ambas en paralelo, y se estudió reproductibilidad interobservador por laboratorios independientes para la determinación de ELISA-IgG. La mejor S se verificó en IgG (82,7%); la mayor E y VPP con DD5 (94,7% y 92,9% respectivamente). Al estudiar la eficacia de las pruebas en paralelo, se verificó que las variables no sufrieran una mejoría significativa. La determinación de ELISA-IgG se consideró confiable, con un grado de acuerdo en la medición superior al 86% tanto para casos como controles. DD5 aparece como una prueba más específica y con mayor VPP que ELISA-IgG pero esta última es más sensible. El uso combinado de éstos no mejora la eficacia diagnóstica.

PALABRAS CLAVES: *Echinococcus granulosus, quiste hidatídico, hidatidosis hepática, serodiagnóstico*

SUMMARY

Preoperative diagnostic confirmation of hydatidosis is based on the detection of parasitic antigens, like DD5 and IgG. The goal of this study is to determine the efficacy of DD5 and ELISA-IgG in patients with hepatic hydatidosis (HH) and to determine reproductibility of the ELISA-IgG test performed at 2 independent laboratories. DD5 and IgG were determined in 75 patients with HH and 75 patients with cholelithiasis (controls). For the HH cases, surgery was considered as the standard for confirmation whereas abdominal ultrasonography and chest X rays were considered the reference standards for the controls. The sample size for sensitivity (S) was calculated assuming a 99% confidence interval (CI), an expected S of 90% and

worst result of 80%. The sample size for specificity (SP) was calculated assuming a CI of 99%, expected SP of 95% and worst result of 85%. S, SP, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were calculated for each diagnostic test separately and for both tests in parallel. Interobserver reproductibility for the ELISA-IgG test was studied for independent laboratories. The best S was found for the IgG test (82.7%); the best SP and PPV were found with the DD5 test (94.7% and 92.9%, respectively). No significant differences were found for the efficacy of the tests performed in parallel. The ELISA-IgG test was found to be reliable, with an agreement over 86% both for cases and controls. DD5 is more specific and shows better PPV than the ELISA-IgG test, although the latter is more sensitive. Combined use of both tests does not improve diagnostic efficacy.

KEY WORDS: *Echinococcus granulosus, hydatidic cyst, liver hydatidosis, serologic diagnosis*

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de hidatidosis hepática (HH) se ha basado en tres pilares: el antecedente epidemiológico, las imágenes (especialmente la ecotomografía abdominal) y la determinación de antígenos parasitarios, entre los cuales existen varias pruebas diagnósticas que se han desarrollado y utilizado a lo largo de la historia. En la actualidad las más usadas son la electroforesis de proteínas para DD5 ó arco 5° de Caprón y la determinación sérica de inmunoglobulinas G y E (ELISA-IgG y ELISA-IgE).^{1,2}

Existen comunicaciones previas que mencionan una sensibilidad entre 69% y 90% para DD5, de 81% para ELISA-IgG y 63% para ELISA-IgE; y especificidades de 100% para DD5, entre 84% y 100% para ELISA-IgG y 96% para ELISA-IgE, atribuyéndose a reacciones cruzadas con otros parásitos los resultados falsamente positivos.³⁻⁸

En nuestro centro se utiliza desde 1990³ ELISA-IgG como prueba diagnóstica para enfermedad hidatídica y en los últimos años hemos venido observando que la sensibilidad y especificidad de esta técnica es aparentemente inferior a la reportada en la literatura, por otra parte, hemos perdido paulatinamente la determinación de DD5 debido en parte a la mayor cantidad de antígeno que se requiere para su realización respecto a las otras técnicas² y a la dificultad en el acceso a antígenos ovinos para su elaboración debido a la no-obligatoriedad actual de sacrificar ovinos en los mataderos públicos, que era desde donde se obtenía el material apropiado para su realización.

Dadas estas razones, el objetivo principal de este trabajo es determinar la eficacia de serología específica para HH con las técnicas DD5 y ELISA-IgG por separado y en paralelo; y el objetivo secundario es determinar la reproducibilidad entre dos laboratorios independientes en la determinación de ELISA-IgG.

MATERIAL Y MÉTODO

Tipo de estudio

Estudio de pruebas diagnósticas

Población

Se estudiaron 75 pacientes con HH prevalentes y hospitalarios, y 75 pacientes sin HH, portadores de colelitiasis, incidentes y hospitalarios. Todos ellos sin restricciones de edad ni sexo, intervenidos quirúrgicamente en el Hospital Regional de Temuco.

Se excluyeron del estudio pacientes con coexistencia de hidatidosis en otra localización, hidatidosis recidivada, enfermedades hepáticas crónicas, disfunciones orgánicas concomitantes, coledocolitiasis y que presentasen en forma simultánea otras lesiones quísticas evidenciadas en los estudios de imágenes.

Se consideraron en el estudio las variables bioclínicas de los sujetos en estudio, como también el valor de algunas pruebas diagnósticas generales y de función hepática utilizadas.

Medición

Se consideró a la cirugía como el estándar de referencia, pues mediante ésta se evidenció y descartó la HH. En los sujetos sin HH, se agregó como complemento del estándar de referencia la ecotomografía abdominal y la radiología de tórax, métodos con los que se descartó la existencia de lesiones quísticas torácicas y abdominales.

Tanto para los sujetos con y sin HH se obtuvieron muestras de sueros, las que fueron congeladas a -20 °C hasta el momento de su análisis. Una vez recolectadas las muestras necesarias, una parte de ellas fue enviada al Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), para la determinación de ELISA-IgG,

DD5; y otra al Laboratorio de Inmunología del Hospital Regional de Temuco (HRT) para el estudio de reproducibilidad de la técnica de ELISA-IgG. Para estos efectos, todas las muestras fueron identificadas con un número correspondiente a los tres últimos dígitos de la ficha clínica, sin otra información adicional, por ende, cegadas a ambos laboratorios.

El antígeno utilizado para las técnicas serológicas correspondió a líquido hidatídico de origen ovino dializado con agua destilada y liofilizado según método de Varela-Díaz.⁴

Para la determinación de DD5, se utilizó la técnica de inmunoprecipitación en gel de agarosa, para detectar de esta manera la presencia de anticuerpos contra el antígeno 5 del *Echinococcus granulosus* a través de la reacción de identidad inmunológica con un suero control. El antígeno se utilizó en una suspensión a una concentración de 50 mg/ml con solución fisiológica tamponada a pH 7,4; se consideró como positiva toda muestra con una o más bandas de precipitación en presencia del arco 5^o.⁴

Para ELISA-IgG, se utilizó enzimoimmunoanálisis con técnica de ELISA, con solución de antígeno a una concentración de 5 µg de proteínas/ml con buffer de carbonato a pH de 9,6. Se consideró como positiva toda muestra cuya lectura fuera igual o mayor al valor de corte, el que se obtiene mediante la ecuación $VC = C_{neg} N^{\circ} 1 + C_{neg} N^{\circ} 2 + 0,1$ (VC es el valor de corte; C_{Neg} N^o 1 el control negativo N^o 1; y C_{Neg} N^o 2, el control negativo N^o 2).⁹

Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra fue calculado con base a 99% intervalo de confianza, sensibilidad esperada de 90% y peor resultado de 80%, una especificidad esperada de 95% y peor resultado de 85%.

Según estos cálculos, obtenidos con programa Epi-6[®],¹⁰ se verificó que la muestra mínima para llevar a cabo esta investigación es de 59 individuos con HH y de 31 sujetos sin HH. Con base en estos datos, se decidió determinar S y E con 75 casos y 75 controles emparejados por edad.

Análisis estadístico

Se determinó sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) para cada prueba diagnóstica. A continuación se aplicó una regresión logística múltiple para determinar la sensibilidad de los métodos combinados entre sí y estudio de reproductibilidad interobservador aplicando estadística Kappa,¹¹ para la determinación de reproducibilidad de las mediciones de ELISA-IgG.

RESULTADOS

La edad promedio de los pacientes con HH fue de 43,5 ± 16,8 años y el sexo se distribuyó en forma homogénea. Por su parte, en los sujetos sin HH se verificó un promedio de edad de 44,9 ± 14,5 años y una distribución por sexo predominantemente femenino.

Por otro lado, el estudio de variables de laboratorio general permitió constatar diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con y sin HH, observándose que en los primeros, estos parámetros se encontraban alterados en relación con los otros (Tabla 1).

El 59% de los pacientes con HH (44 casos), presentaron un solo quiste hidatídico hepático y el 41% restante (31 casos) eran portadores de dos o más lesiones quísticas. El diámetro promedio fue de 15,0 ± 6,3 cm (5 a 30 cm). Por otra parte, el 56% de los pacientes (42 casos), presentaban comunicaciones biliares.

Tabla 1
CARACTERISTICAS BIOCLINICAS DE LOS SUJETOS EN ESTUDIO

Variable	Controles (n= 75) Promedio ± DE	Casos (n= 75) Promedio ± DE	p
Edad (años)	44,9 ± 14,5	43,5 ± 16,8	0,5231
Sexo (%)			
Femenino	95	61	0,0001
Masculino	5	39	
Leucocitos totales (xmm ³)	6252 ± 1768	8410 ± 2904	0,0001
Bilirrubina total (mg/dL)	0,5 ± 0,2	0,9 ± 0,9	0,0002
Fosfatasa alcalina (U/L)	199 ± 55	433 ± 421	0,0001
ASAT (U/L)	18,4 ± 5,1	38,1 ± 41,5	0,0005
ALAT (U/L)	20,0 ± 9,8	37,7 ± 45,8	0,0046

La mejor sensibilidad se obtuvo con la determinación de ELISA-IgG HRT (85,3%); y la mayor especificidad con DD5 (94,7%). Por otra parte, DD5 presentó un mejor VPP (92,9%) y ambas determinaciones de ELISA-IgG presentaron mejor VPN (Tabla 2).

Al estudiar los resultados de la aplicación de ambas pruebas en forma simultánea (DD5 + ELISA-IgG), ésta no fue superior a cualquiera de ellas por separado, obteniéndose cifras de S, E, VPP y VPN de 82,3%; 85,3%; 84,9% y 83,1% respectivamente.

Del estudio reproducibilidad, se desprende que el grado de acuerdo en la determinación de ELISA-IgG fue superior al 86% tanto para pacientes con y sin HH, y el error en la medición fluctuó entre 10% y 26% respectivamente (Tabla 3).

DISCUSIÓN

La HH como cualquier entidad nosológica debe ser diagnosticada y tratada en forma oportuna. Una de las alternativas es la realización de campañas de tamizaje en poblaciones de alto riesgo, es decir aquellas que habitan zonas donde se ha determinado una alta prevalencia de la enfermedad; y la otra, es la adecuada confirmación diagnóstica de HH en un paciente con una masa quística en el hígado. Ambas situaciones determinan la necesidad de contar con herramientas que otorguen un grado significativo de seguridad diagnóstica, pues la terapia de esta enfermedad demanda habitualmente un procedimiento quirúrgico, el que como se sabe se asocia a elevadas cifras de morbilidad y una mortalidad no despreciable.¹²

Con relación a las características bioclínicas de las poblaciones que fueron objeto de estudio nos parece de interés destacar la gran similitud de la variable edad debido al emparejamiento realizado previo al desarrollo del estudio, hecho muy diferente a lo que se puede observar en relación con la variable sexo, pues en el grupo de pacientes sin HH predominó el sexo femenino al compararlo con el grupo de pacientes con HH, hecho que se explica porque los pacientes sin HH corresponden a

Tabla 2
EFICACIA DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN ESTUDIO

Prueba diagnóstica	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
DD5	69,3	94,7	92,9	75,5
ELISA-IgG (ISP)	82,7	86,7	86,1	83,3
ELISA-IgG (HRT)	85,3	77,8	80,0	83,6

Tabla 3
REPRODUCIBILIDAD DE LA MEDICIÓN DE ELISA-IgG*

Población	Acuerdo (%)	Indice Kappa	Error (%)
Casos	86,4	0,72	10,7
Controles	89,3	0,60	26,7

* (Instituto de Salud Pública vs Hospital Regional de Temuco).

colecistomizados electivos por coleditiasis, entidad que afecta predominantemente al género femenino.

Las diferencias verificadas en las variables de laboratorio de ambos grupos pueden obedecer a la enfermedad hepática que significa la HH, pues y como se expuso anteriormente en los resultados, algo más del 40% de los casos presentaba más de un quiste hidatídico hepático y el diámetro promedio de las lesiones fue de 15,0 cm, hecho que de por sí representa un efecto de masa suficiente para alterar algunas pruebas de función hepática (especialmente las fosfatasas alcalinas).^{12,13}

Al evaluar la eficacia de las pruebas diagnósticas específicas para HH encontramos sensibilidades y especificidades menores a las reportadas en la literatura tanto nacional como internacional.^{14,15} Probablemente lo anterior se deba al mosaico antigénico que presenta el parásito y sobre todo a las diferencias de sensibilidad del huésped con respecto a su respuesta inmunológica. La sensibilidad verificada para DD5 (69,3%) se encuentra muy por debajo de los estándares reportados, sin embargo, ésta se compensa con cifras de especificidad y VPP (94,7% y 92,9%) similares a algunas publicaciones.^{2,3,6,7} Es posible que los falsos positivos puedan corresponder a reacciones cruzadas con otras parasitosis, principalmente la cisticercosis, que se ha considerado como la principal reacción cruzada del *Echinococcus granulosus* detectada como falso positivo con DD5. A la luz de nuestros resultados, nos parece que el DD5 es una prueba diagnóstica eficaz debido a su elevada especificidad, pero de baja utilidad en campañas de tamizaje debido a su baja sensibilidad.

Para ELISA-IgG se han descrito sensibilidades y especificidades para enfermedad hidatídica en general, que superan el 95%,¹⁶ hecho que en nuestra experiencia no se ha reproducido, pues estas variables resultaron inferiores al 86% en ambas determinaciones. Estas diferencias podrían explicarse porque quizás estemos ante la presencia de cepas diferentes de *Echinococcus granulosus*, o porque se trata de quistes de gran tamaño, algunos con complicaciones evolutivas; o quizás el número

de lesiones coexistentes y/o de parasitaciones previas puedan jugar algún rol en esta observación, que puede explicarse a la luz de estas reflexiones en un bajo estímulo antigénico del huésped y, por ende, una menor respuesta inmunológica. Por lo tanto, queda abierta una ventana a la investigación futura para determinar si los distintos estados evolutivos de la HH y las características macroscópicas del quiste se asocian a una mayor o menor positividad de las pruebas diagnósticas específicas. No obstante esto, la mayor sensibilidad de este método con relación a DD5 y la mayor disponibilidad de éste nos hace pensar que puede ser la prueba de mayor utilidad en campañas de tamizaje, dejándose DD5 como certificación diagnóstica.

Del estudio de reproducibilidad interobservador de la prueba de ELISA-IgG en los dos laboratorios en los que se llevó a cabo pudimos observar similitud en la sensibilidad, pero no así en la especificidad y VPP (superiores en el ISP), sin embargo, y a pesar de existir un error en la medición de 10,7% para los casos y 26,7% para los controles, el grado de acuerdo superior al 86% y el índice kappa registrado entre 0,60 y 0,70 (que es considerado como apropiado),¹¹ en especial cuando trabajamos con un intervalo de confianza del 99%, permiten señalar que la determinación de ELISA-IgG es reproducible entre ambos laboratorios. No obstante este frío pero sustancial análisis matemático, la discordancia de 10,5% en los casos, significa que 8 pacientes con la enfermedad no están siendo diagnosticados por el laboratorio (5 no los diagnostica el ELISA-IgG HRT y 3 no los diagnostica el ELISA-IgG ISP; esto representa un déficit diagnóstico para pacientes con HH del 62,5% y 38,0% respectivamente).

Otro aspecto a considerar es que nuestros pacientes corresponden a una realidad local y hospitalaria que no necesariamente refleja la realidad nacional ni menos internacional, pudiendo tener la HH en nuestro medio un comportamiento distinto, lo que podría ayudar a explicar los resultados obtenidos.

En un futuro próximo estudiaremos otras alternativas diagnósticas como técnicas de enzimoinmunoensayo que parecen ser de mayor sensibilidad y especificidad. Estamos conscientes del gran avance que ha existido en relación al desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas específicas para el diagnóstico de hidatidosis, avance que aún continúa y en el que han aparecido nuevas técnicas como las de biología molecular que detectan material genético del parásito en el huésped a través de la reacción de polimerasa en cadena la cual quizás llegue en el futuro próximo a constituir una herramienta de gran valor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Manterola C, Acencio L, Bahamondes JC, Barroso M: Hidatidosis hepática: Estudio descriptivo de algunos aspectos clínicos y terapéuticos. *Rev Chil Cir* 1997; 49: 352-9.
2. Gutiérrez R, Muñoz F, Oberg C: Conclusiones, II Jornada Nacional de Hidatidosis. *Rev Méd Sur* 1991; 16: 8-9.
3. Inostroza J, Díaz P, Espinoza R *et al*: Detección de inmunoglobulina "G" específicas para *E. granulosus* en hidatidosis humana. *Rev Méd Sur* 1991; 16: 15-7.
4. Varela-Díaz V, Guarnera E, Coltrorti E: Ventajas y limitaciones de los métodos inmunológicos y de detección por imágenes para el diagnóstico de la hidatidosis. *Bol Of Sanit Panam* 1986; 100: 369-82.
5. Irbuena O, Nieto A, Ferreira AM, Battistoni J, Ferragut G: Characterization and optimization of bovine *Echinococcus granulosus* cyst fluid to be used in immunodiagnosis of hydatid disease by ELISA. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2000; 42: 255-62.
6. Navarrete N, Jersic MI, Denis R: Comparison of 3 techniques in the serological diagnosis of human hydatidosis. *Bol Chil Parasitol* 1995; 50: 97-100.
7. Larrieu E, Dapcich C, Guarnera E *et al*: Evaluation of ELISA and double diffusion (DD5) test in the diagnosis of human hydatidosis in asymptomatic population. *Rev Sanid Hig Publica* 1994; 68: 393-8.
8. Contreras MC, Gallo S, Salinas P *et al*: Evaluación de la ELISA IgG, usando un antígeno purificado en el diagnóstico de la hidatidosis humana. *Bol Chil Parasitol* 1994; 49: 24-30.
9. Jercic M, Astorga B: Estandarización de la técnica enzimo inmunoensayo para el diagnóstico de hidatidosis humana. *Rev Chil Tec Médica* 1998; 18: 15-20.
10. Dean AG: Epi InfoVersion 6: A word Processing, database and statistics system for epidemiology on microcomponents. Atlanta, Georgia 1994; 399-401.
11. Muñoz SR, Bangdiwala SI: Interpretation of Kappa and B statistics measures of agreement. *J App Stat* 1997; 24: 105-11.
12. Manterola C, Molina E, Fernández O *et al*: Quistectomía subtotal. Una alternativa quirúrgica racional en el tratamiento de la hidatidosis hepática. *Rev Chil Cir* 1998; 50: 621-9.
13. Manterola C, Soto JL, Chodowiecki A *et al*: Hidatidosis hepática. Consideraciones clínicas y terapéuticas. *Rev Méd Sur* 1997; 19: 37-42.
14. Arienti H, Guignard S, Rinaldi D, Elbarcha O: Comparación de dos métodos serológicos para el diagnóstico de hidatidosis. *Bol Oficina Sanit Panam* 1996; 121: 221-7.
15. García A, Denegri M, Ljungstrom I, Lorca M: Identification of immunodominant antigens by immunoelectrotransfer in hydatid fluid. *Bol Chil Parasitol* 1998; 53: 58-64.
16. Lorca M, Escalante H, García A *et al*: Estandarización y evaluación de una técnica de ELISA para el diagnóstico de la hidatidosis humana. *Parasitología al Día* 1991; 15: 74-8.