

POSSIBILITATEA DE UTILIZARE A TESTULUI ELISA ÎN SUPRAVEGHEREA ECHINOCOZOZEI ÎN REPUBLICA MOLDOVA

Vera LUNGU, Ana VARTICEAN, Centrul Național de Sănătate Publică,
Ion DOBÂNDĂ, CSP Fălești,
Lidia BORDEIAN, CSP Orhei,
Galina PETREAC, CSP Râșcani,
Vasile MUNTEANU, CSP Telenesti,
Ion CALMĂC, CSP Căușeni,

Summary

The Possibility of Using an ELISA Test for Surveillance of Echinococcosis in the Republic of Moldova

The analysis of the presence of IgG anti-*E. granulosus* using ELISA revealed a positivity rate of 3.0 per cent with a range between 1.2 per cent in Orhei and 9.2 per cent in Telenesti. There was no significant difference in the distribution of seropositivity among men and women, their share being 51.0 and 49.0 per cent respectively. Evaluation of results by the type of activity shows that there is no relationship between the type of activity and rate of seropositivity. Many positive results were found among patients in the age group 30-50. Of the 51 positive results in ELISA test, only 5 patients were confirmed by Western Blot test.

Key words: echinococcosis, morbidity, ELISA test, Western Blot test, epidemiological surveillance.

Резюме

Возможности использования теста ELISA в надзоре эхинококкоза в Республике Молдова

Обследование на наличие антител к *E. granulosus* при помощи теста ELISA обнаружило 3% положительных результатов, в диапазоне от 1,2% в районе Орхей до 9,2% в Теленести. Не было обнаружено выраженной зависимости между положительными результатами среди мужчин и среди женщин, что составило соответственно 51,0% и 49,0%. Не выявлена зависимость между родом деятельности и долей положительных результатов. Наибольшее количество серо-позитивов приходится на возрастную группу 30-50 лет. Из 51 положительных результатов, полученных при помощи теста ELISA, 5 были подтверждены в тесте Иммуноблот.

Ключевые слова: эхинококкоз, заболеваемость, тест ELISA, Иммуноблот, эпидемиологический надзор.

Introducere

Echinococoză chistică (chistul hidatic) este o invazie zoonotică a oamenilor și a animalelor domestice, cauzată de stadiul larvar al *Echinococcus granulosus*. Un număr impunător de rapoarte recente indică faptul că această invazie rămâne a fi o problemă de sănătate publică, deoarece are încă o răspândire geografică largă, deși un control eficient împotriva acestei cestodoze a fost realizat cu succes în unele regiuni. Debutul asimptomatic al patologiei cauzează o evidență statistică incompletă, formată, practic, de cazurile chirurgicale de hidatidoză. În acest context, studiile serologice sunt foarte importante în evaluarea situației epidemiologice reale.

Diagnosticul echinococozii chistice (EC), de obicei, se bazează pe simptome clinice, tehnici imagistice și, în special, pe depistarea anticorpilor specifici din serul pacienților. Tactica diagnosticului imunologic, în funcție de stadiul bolii și de tratament, încă se studiază. Timp de decenii, multe companii au fost furnizoare de truse cu antigeni comerciali *Echinococcus* și teste de echinococoză, bazate pe diferite metode: test de fixare a complementului (TFC), metode electroforetice (IEF) în trecut și testul RHA1, imunoenzimatic (ELISA) și Western Blot (WB) în ultimii ani.

Au fost evaluate mai multe metode de serodiagnostic al bolii hidatice chistice provocate de *Echinococcus granulosus*. S-a dovedit că toate, în proporție diferită, au unele dezavantaje, cum ar fi discrepanța în rezultatele și ratele mari de seropozitivitate false, provocând divergențe semnificative între laboratoare [1].

Serul de la 176 de pacienți cu un istoric epidemiologic sau semne clinice și radiologice de hidatidoză a fost testat prin RIEF și prin testul enzimatic ELISA. Rezultatele au fost comparate cu datele din studiile suplimentare și au fost confirmate prin examen radiologic de chist excizat. Biopsia a confirmat diagnosticul de hidatidoză la 65 de pacienți (37%) și a demonstrat prezența altor boli în restul 111 (63%). Din 176 de pacienți, 36 (20,4%) au fost pozitivi în RIEF și 62 (35,2%) – în testul ELISA. Ambele metode au demonstrat o excelentă corelare cu diagnosticul postoperatoriu și nu au prezentat rezultate false. Testul ELISA a dat rezultate fals-negative pentru 3 pacienți (4,6%), cu chisturi care au fost infectate, infertile sau parțial calcificate [2].

Studiul efectuat ulterior prin RHA1 și testul ELISA a cuprins 5556 de persoane sănătoase. Dintre acestea, 42 (0,8%) au avut rezultate pozitive în ambele teste serologice, ceea ce constituie 754.6 cazuri la 100000 populație. Aceste 42 de persoane au fost programate pentru ecografie la ficat și radiografia toracică, dintre care s-au efectuat 26, la 16 demonstrându-se imagini compatibile cu hidatidoza. Aceste 16 cazuri au fost trimise pentru o intervenție chirurgicală. În 9 cazuri diagnosticul a fost confirmat chirurgical, prevalența constituind 161,7 la 100000 populație [1].

În Austria, în ultimii ani, au fost efectuate două studii pentru a evalua sensibilitatea și specificitatea a doi antigeni comerciali *E. granulosus*. Serul pacienților histologic și/sau biologic-molecular

confirmați cu echinococoză chistică, a pacienților cu alte invazii parazitare și a persoanelor în aparență sănătoase au fost testate pentru anticorpi specifici *anti-Echinococcus*. Studiile au demonstrat că atât antigenii comerciali, cât și kiturile de testare ar trebui să fie folosite ca un test primar într-un laborator de rutină pentru diagnosticul echinococozei chistice [4]. Studii analogice au fost efectuate și în alte țări, concluzia fiind că testul *ELISA*, cu folosirea antigenului nativ B, este o metodă corespunzătoare și preferabilă pentru imunodiagnosticul de hidatidoză umană [8, 9].

Hidatidoza umană este o boală zoonotică răspândită și în regiunea Castilla y León din Spania. Studiul seroprevalenței infecției cu *Echinococcus granulosus* în această regiune s-a efectuat pe 4824 probe de ser de la o populație reprezentată de indivizi în aparență sănătoși, din fiecare provincie din Castilla y León, obținute pe parcursul unui an. O enzimă pentru imunologie indirectă, preparată în laborator respectiv, a fost folosită pentru a determina prezența de anticorpi *IgG anti-Echinococcus granulosus* în aceste probe. Anticorpi *IgG anti-Echinococcus granulosus* au fost detectați în 3,4% (164/4824) din eșantionul studiat, cu o gamă de la 1,26% la 7,10%, în funcție de provincie. Seroprevalența anticorpilor a crescut semnificativ odată cu vârsta, dar nu au existat diferențe semnificative legate de sex (bărbați 3,66% față de 3,14% femei). Aceste date contribuie la supravegherea hidatidozei în cadrul programului de control al acestei boli [4].

Valoarea informativă a testului *Western Blot*, comparativ cu alte metode tradiționale de imunodiagnostic, a fost demonstrată într-un studiu de evaluare a pacienților după intervenția chirurgicală în hidatidoză. Au fost studiate 71 seruri ale bolnavilor cu hidatidoză, confirmată prin intervenție chirurgicală. Toate acestea au fost serologic negative la hidatidoză (testul *ELISA*, hemaglutinare, imunoelectroforeză). Serul a 12 pacienți a fost urmărit în termen de 2 ani pre- și postoperatoriu. Testul *Western Blot* a confirmat diagnosticul corect de hidatidoză în 67,6% cazuri. Rata de pozitivitate a fost de 100% pentru chisturile multiveziculare de ficat, 60% pentru chisturile mici și 50% pentru cele calcificate. *Western Blot* a permis un diagnostic corect al chisturilor pulmonare în 62,5% din cazuri, iar în 50% – în localizările cranio-spinale [7].

Între 1 ianuarie 2002 și sfârșitul lunii decembrie 2006, 1323 de pacienți suspecți cu EC la examenul ultrasonografic, au fost examinați serologic pentru această boală la Departamentul de Parazitologie, Institutul de Microbiologie și Imunologie, Facultatea de Medicină din Ljubljana. Serurile au fost obținute de la pacienți de ambele sexe, de vârste diferite și din diverse părți ale Sloveniei. Serurile au fost verificate prin *RHAI* (*Cellognost-Echinococoză, Dade Behring, Marburg, Germania*). 127 de seruri au dat rezultate pozitive prin testul *RHAI* în titre înalte; 74 seruri au fost pozitive în titruri scăzute 1:32-1:128; 4 au fost pozitive în titrul 1:256 și unul – în titrul 1:512. Toate serurile cu titre scăzute au fost reinvestigate prin

testul *Western Blot* (*BM, Diagnostic LDBIO, Lyon, Franța*). Din 127 de seruri *RHAI*-pozitive, numai 48 au fost pozitive pentru echinococoză prin acest test. Din 48 de seruri, 32 au fost de la pacienți cu chisturi la nivelul ficatului și două seruri ale celor cu echinococoză pulmonară. 24 de seruri au fost de la femei, iar 10 – de la bărbați. Vârsta medie a pacienților depistați pozitiv cu EC a fost de 58,3 ani. Toate serurile testate pozitiv la EC prin testul *WB* au fost negative pentru cisticercoză [7].

Rezultate similare prezintă și savanții polonezi. Au fost investigate 46 de probe de ser și 1 lichid cefalorahidian (LCR) de la 47 de pacienți suspecți de echinococoză prin metoda *WB*, iar rezultatele au fost comparate cu cele ale hemaglutinării indirecte, imunoelectroforezei și testului enzimatic *ELISA*. Anchetă a confirmat înalta sensibilitate și specificitate a testului *WB*. Datele de mai sus au sprijinit conceptul că diagnosticul serologic al echinococozei ar trebui să fie efectuat folosind un test-screening de înaltă sensibilitate, cum ar fi *ELISA*, iar metoda *Western Blot* – pentru a verifica rezultatele pozitive [3].

În prezent este cunoscut faptul că aproximativ 67% din pacienții cu chisturi hepatice sunt asimptomatici, rămânând astfel pe tot parcursul vieții. Această situație poate fi corectată cu testele imunologice specifice: utilizarea testului *ELISA*, care are o sensibilitate de 63% și o specificitate de 97% la purtătorii asimptomatici; testul respectiv oferă o sensibilitate de doar 31% la aceeași categorie de pacienți. Pe de altă parte, și studiile de imagistică, pe baza examenului ecografic, la fel au devenit o metodă de elecție pentru detectarea purtătorilor asimptomatici. Ecografia depistează de la 49% până la 73% din acești pacienți, fapt ce confirmă că ele pot fi, la fel, folosite ca parte componentă a unui sistem de supraveghere epidemiologică și management în programul de control [5].

După nivelul de răspândire atât la om, cât și la animale, Republica Moldova se plasează printre primele locuri în Europa, morbiditatea medie, în ultimul deceniu, constituind 4,74 cazuri la 100000 populație [10]. Până în prezent, depistarea bolnavilor rămâne a fi pasivă, mai frecvent la examinările instrumentale ocazionale, motiv pentru care boala este depistată în stadiu avansat, fapt ce provoacă complicații, recidive și, ca urmare – invaliditate. Din acest motiv, există o necesitate mare de noi progrese în prevenirea și controlul acestei boli neglijate.

Materiale și metode

Drept material de studiu au servit 1838 de probe de ser sangvin, colectate din 14 raioane ale republicii, divizate în 4 grupuri, în funcție de indicele de morbiditate prin echinococoză în ultimul deceniu: raioanele din partea stângă a Nistrului și Călărași (0,1-1,0/100000 populație); Orhei, Chișinău, Anenii Noi și Ștefan Vodă (1,1-5,0/100000); Cahul, Căușeni, Ungheni, Fălești și Râșcani (5,1-10,0/100000); Telenești, Cantemir și Comrat (10,1 și >), media pe

republică fiind de 4,7/100000 populație. Eșantionul a fost selectat cu considerația de a întruni toate categoriile de vârstă: 164 (8,9%) persoane cu vârsta de până la 17 ani; 263 (14,3%) de 18-30 ani; 292 (15,9%) de 31-40 ani; 421 (22,9%) de 41-50 ani; 444 (21,4%) de 51-60 ani și 254 (13,8%) de 60 și > ani.

S-a ținut cont și de genul de activitate. În studiu au fost incluse persoane care, conform genului de activitate, contactează mai puțin cu animalele agricole (lucrători medicali, pedagogi, muncitori și slujbași) și persoane care, nemijlocit, contactează cu ele (medici și felceri-veterinari, lucrători din unitățile zootehnice, angajații de la abatoare), inclusiv proprietari de animale agricole.

Au fost examinați 795 de bărbați (43,2% din eșantionul examinat) și 1043 de femei (respectiv 56,8%).

IgG – *Echinococcus granulosus* – a fost depistat prin metoda ELISA, cu folosirea truselor de diagnosticare *Echinococcus granulosus* (IgG) – ELISA, NovaLisa, NovaTec Immunodiagnostica, Germany, cu sensibilitatea și specificitatea >95%. Cazurile seropozitive au fost investigate de 2 ori prin testul de confirmare Western Blot, folosind trusele de diagnosticare *Echinococcus granulosus* (IgG) WESTERNBLOT, EUROIMMUN, Medizinische Labordiagnostika AG, cu specificitatea 100% și sensibilitatea 86%.

Rezultatele studiului au fost prelucrate statistic, cu determinarea coeficientului de corelație (r) și diferenței semnificative (t).

Rezultate

Studiul serologic inițial a pus în evidență 51 ($3,0\% \pm 0,4$) persoane la care s-au depistat Ig – anti-*E.granulosus*, cu o marjă de $1,2\% \pm 0,8$ la Orhei și $9,2\% \pm 2,4$ la Telenești (tabelul 1).

Tabelul 1

Rezultatele investigațiilor la echinococoză prin testul ELISA

Nr. ord.	Raionul	Persoane examinate	Persoane seropozitive	Rata seropozitivităților, %, $\pm m$
1	2	3	4	5
1	Călărași	137	3	2,2 \pm 1,2
2	Comrat	223	7	3,1 \pm 1,2
3	Căușeni	138	2	1,5 \pm 1,0
4	Orhei	166	2	1,2 \pm 0,8
5	Anenii Noi	121	2	1,7 \pm 1,2
6	Raioanele din stânga Nistrului	120	2	1,7 \pm 1,2
7	Râșcani	94	2	2,1 \pm 1,4
8	Chișinău	174	5	2,9 \pm 1,3
9	Cahul	25	1	4,0 \pm 3,9
10	Cantemir	64	2	3,1 \pm 2,1
11	Ștefan Vodă	103	4	3,9 \pm 1,9
12	Telenești	141	13	9,2 \pm 2,4
13	Ungheni	130	-	-
14	Fălești	202	6	3,0 \pm 1,2
Total		1838	51	3,0 \pm 0,4

Pentru comparație: în perioada 2000-2007, raionul Orhei a prezentat o morbiditate medie de 1,5/100 000 populație, iar raionul Telenești – respectiv 11,8/100 000 populație.

La compararea seroprevalenței din raioanele hiperendemice (Comrat, Cantemir și Telenești) cu cea din raioanele care înregistrează indici de morbiditate mai mici în comparație cu media pe republică (Orhei, Călărași și raioanele din stânga Nistrului), se observă că există o diferență semnificativă între acești indici ($t=2,9$, $P<0,01$).

Compararea ratelor de seropozitivitate cu indicele morbidității, în raioanele respective, denotă o corelație directă medie a acestor indici (figura 1), indicele de corelație r având o valoare de + 0,50.

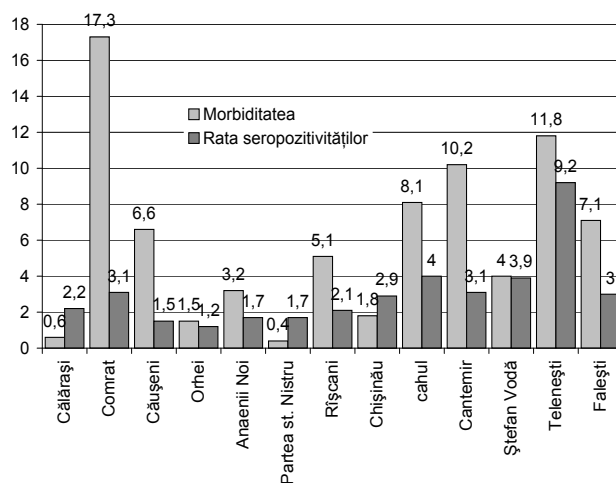


Figura 1. Corelația indicelui de morbiditate cu rata persoanelor seropozitive pe raioane.

Numărul de probe seropozitive se distribuie printre bărbați și femei aproximativ cu aceeași frecvență și constituie respectiv 51% și 49% ($t=0,51$, $P>0,05$). Acest fenomen se observă și în structura morbidității: rata bărbaților și cea a femeilor constituind 51,2 și, respective, 48,8% ($P>0,05$).

Evaluarea rezultatelor în funcție de genul de activitate demonstrează că nu există o dependență între genul de activitate și rata subiecților seropozitivi (tabelul 2).

Tabelul 2

Rezultatele investigațiilor la echinococoză prin testul ELISA în funcție de genul de activitate

Nr. d/o	Genul de activitate	Persoane examinate, abs.	Persoane seropozitive, abs.	Rata seropozitivităților, %, $\pm m$
1	Ciobeni, medici-veterinari, ang. abatoare	184	4	2,2 \pm 1,17
2	Posesorii de animale agricole	505	16	3,2 \pm 0,61
5	Lucrători medicali, pedagogi	183	6	3,3 \pm 1,74
6	Muncitori și slujbași	347	9	3,0 \pm 0,84
7	Elevi și studenți	177	2	1,1 \pm 0,61
8	Șomeri	235	5	2,1 \pm 0,87
9	Pensionari și invalizi	207	9	4,3 \pm 1,99

Astfel, persoanele care nu contactează cu animalele domestice (medici, pedagogi, muncitori și slujbași) înregistrează, practic, același indice ca și persoanele ce țin sau îngrijesc animale agricole: ciobeni, medici-veterinari, angajați ai abatoarelor, posesorii de animale agricole ($t = 0,11$, $P > 0,05$). Aceeași situație a fost observată și la repartizarea, după acest criteriu, a cazurilor de îmbolnăviri. Studiile similare efectuate în alte țări constată că acest fenomen este caracteristic pentru comunitățile în care este foarte răspândit vagabondajul canin, responsabil de poluarea și circulația intensă a agentului etiologic în mediu.

Distribuția cazurilor după categorii de vârstă pune în evidență faptul că cota majoră (38 persoane, 74,5%) a cazurilor seropologic pozitive revin pe seama segmentului de vârstă 18-60 de ani (figura 2).

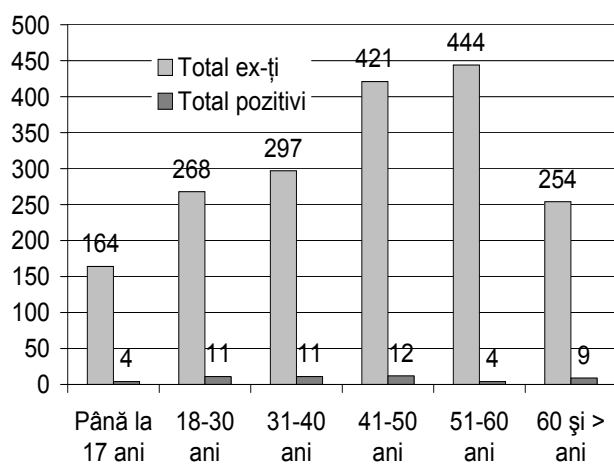


Figura 2. Rezultatele investigațiilor la echinococoză, testul ELISA, pe categorii de vârstă.

La repartizarea cazurilor chirurgicale de hidatidoză după același criteriu, acestui segment de vârstă îi revin 68,5% din totalul de îmbolnăviri.

Din 51 seruri pozitive prin testul ELISA, au prezentat pozitivitate prin testul WB 5 seruri. Nu s-a observat vreo dependență între titrul testului ELISA și rezultatul testului Western Blot.

Concluzii

1. Rată medie a probelor seropozitive la prezența *Ig anti-E. granulosus-larvae* la populația republicii constituie 3,0%, cu o marjă cuprinsă între 1,2% la Orhei și 9,2% la Telenești. Indici comparativ mai înalți înregistrează raioanele hiperendemice prin echinococoză. Nu există nici o diferență semnificativă în distribuția între bărbați și femei, ponderea lor constituind 51,0 și, respectiv, 49,%, fenomen caracteristic și structurii morbidității.

2. Nu există o dependență între genul de activitate și rata seroprevalenței: astfel intelectualii înregistrează, practic, același indice ca persoanele ce țin și îngrijesc animale agricole. Aceeași situație a fost observată și la repartizarea, după acest criteriu, ca-

zurilor de îmbolnăviri. Acest fenomen demonstrează poluarea și circulația intensă a agentului etiologic în mediu, favorizate de vagabondajul canin.

3. Rezultatele pozitive sunt mai frecvente în segmentul de vârstă 18-60 ani, vârstă care înregistrează 68,5% din cazurile chirurgicale de hidatidoză.

4. Această evaluare ne demonstrează că testul ELISA este fiabil în evaluarea seroprevalenței ecinococozei umane și poate fi implementat în sistemul de monitorizare epidemiologică a echinococozei chistice în Republica Moldova.

Bibliografie

1. Apt W., Pérez C., Galdamez E., Campano S., Vega F., Vargas D., Rodríguez J., Retamal C., Cortés P., Zulantay I., de Rycke P.H., *Echinococcosis/hydatidosis in the VII Region of Chile: diagnosis and educational intervention*, in Rev. Panam. Salud. Publica, 2000, nr. 7(1), p. 8-16.
2. Arienti H. M., Guignard S. I., Rinaldi D. E., Elbarcha O. C., *Comparison of 2 serologic methods for the diagnosis of hydatidosis*, in Bol. Oficina Sanit. Panam., 1996, nr. 121(3), p. 221-7.
3. Bitkowska E., Gołab E., Płonka W., Dzbeński T. H., *Use of western blot methods for serodiagnosis of hydatidosis in Poland*, in Med. Dosw. Mikrobiol., 1997, nr. 49(3-4), p. 215-23.
4. Gutiérrez M.P., Ramírez I., Zarzosa Mdel P., Fernández J.M., Dueñas A.I., Mantecón M.A., et al, *Seroprevalence of infection due to Echinococcus granulosus in the population of Castilla and León (Spain)*, in Enferm. Infecc. Microbiol. Clin., 2003, nr. 21(10), p. 563-567.
5. Larriue E., Frider B., del Carpio M., Salvitti J.C., Mercapide C., Pereyra R., Costa M., Odriozola M., Pérez A., Cantoni G., Sustercic J., *Asymptomatic carriers of hydatidosis: epidemiology, diagnosis, and treatment*, in Rev. Panam. Salud. Publica, 2000, nr. 8(4), p. 250-256.
6. Logar J., Šoba B., Lejko-Zupanc T. and Kotar T., *Serological evidence for human cystic echinococcosis in Slovenia*, in Clinical Microbiology and Infection, 2007, vol. 13, Issue 5, p. 544-546.
7. Makni F., Hachicha L., Mseddi F., Hammami H., Cheikhrouhou F., Sellami H., Sellami A., Mzali R., Boujelbene S., Rebaï R., Beyrouti I., Ayadi A., *Contribution of Western blotting to the diagnosis of hydatidosis*, in Bull. Soc. Pathol. Exot., 2007, nr. 100(3), p. 171-173.
8. Radonjić IV, Dzamić A.M., Arsić-Arsenijević V.S., Djukić S.V., Mitrović S.M., *IgG serum antibody responses in suspected liver cystic echinococcosis patients*, in Srp. Arh. Celok. Lek., 2007, nr. 135(5-6), p. 306-309.
9. Ramos G., Orduña A., García-Yuste M., *Hydatid cyst of the lung: diagnosis and treatment*, in World J. Surg., 2001, nr. 25(1), p. 46-57.
10. Vera Lungu, *Incidența echinococozei/hidatidozei umane în Republica Moldova*, în Sănătate Publică, 2010, nr. 3, p. 44-47.
11. Zarzosa M.P., Orduña Domingo A., Gutiérrez P., Alonso P., Cuervo M., Prado A., Bratos M.A., García-Yuste M., Ramos G., Rodríguez Torres A., *Evaluation of six serological tests in diagnosis and postoperative control of pulmonary hydatid disease patients*, in Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 1999, nr. 35(4), p. 255-262.

Prezentat la 07.07.2011

Vera LUNGU, șef secție supravegherea parazitozelor și a malariei, CNSP, tel. 574-632, e-mail: vlungu@cns.md