

Evaluación de un inmunoanálisis para la detección en heces del antígeno de *Giardia lamblia*

M.^a D. Albaladejo Otón, P.L. Tornel Osorio, M. Pérez-Ayala, C. Carrascosa Romero, P. Martínez Hernández

Resumen

El objetivo del presente estudio ha sido evaluar un enzimoanálisis de doble anticuerpo para determinar la presencia del antígeno de Giardia lamblia en heces. Para ello, se seleccionaron 46 muestras de heces a las que se les realizó un examen microscópico. Observamos quistes de Giardia lamblia en 32 de ellas, mientras que en 14 heces no encontramos el protozoo, aunque sí la presencia de los parásitos intestinales Entamoeba coli, Chilomastix mesnili o Enterobius vermicularis en 11 de estas 14 muestras. Posteriormente, realizamos el inmunoanálisis en el sobrenadante de todas las heces, obteniendo una sensibilidad y especificidad diagnósticas para la giardiasis de 96,87 y 85,71%, respectivamente, comparado con la observación microscópica. Los valores predictivos positivo y negativo, corregidos por la prevalencia de giardiasis en nuestro medio (3,32%) fueron 18,88 y 99,87%, respectivamente. Al separar las muestras en que observamos quistes de Giardia lamblia en 3 grupos según el número de quistes observados al microscopio óptico, encontramos diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre las absorbancias en 2 de los 3 grupos. Estos resultados hacen al método estudiado útil para el cribado de la giardiasis, aunque la observación microscópica sigue siendo necesaria para descartar las muestras falsamente positivas, así como para investigar cualquier otro parásito intestinal.

Introducción

La giardiasis es una enfermedad parasitaria de distribución universal, ocasionada por el protozoo flagelado *Giardia lamblia*. La vía de transmisión es fecal-oral con la ingestión de los quistes. La enfermedad es más frecuente en niños, habiéndose descrito brotes epidémicos en guarderías y por beber agua contaminada (1,2).

El diagnóstico de la giardiasis se suele establecer mediante la investigación de quistes o de trofozoitos a través de técnicas invasivas y no invasivas. Entre estas últimas, el examen microscópico de las heces ha sido la más utilizada. Sin embargo, este método se basa en la experiencia del observador y en la observación de los microorganismos intactos. Así, observando

Summary

The aim of the present study was to evaluate a double-antibody enzyme linked immunosorbent assay for the qualitative determination of Giardia lamblia antigen in feces. For the diagnosis of giardiasis 46 stools were selected by microscopic examination. In 32 of them we observed Giardia lamblia cysts and in 14 we did not find this organism, although intestinal parasites like Entamoeba coli, Chilomastix mesnili or Enterobius vermicularis were observed in 11 of the 14 stools. In all sample supernatants we performed the immunoassay, obtaining a diagnostic sensitivity of 96,87% and a diagnostic specificity of 85,71%, as compared with microscopic observation. Positive and negative predictive values, corrected for the prevalence of giardiasis in our geographic region (3,32%) were 18,88 and 99,87%, respectively. Separating stools in which we had observed Giardia lamblia cysts in 3 groups according to the number of cysts observed by optic microscopy, significant statistical differences ($P < 0,05$) were found between absorbances in 2 of the 3 groups. These results make the method evaluated useful as a screening test of Giardia lamblia in feces, although microscopic confirmation is still necessary to discard false positive stools, as well as to investigate any other intestinal parasite.

una muestra de heces se llega al diagnóstico en un 50-70% de los casos, mientras que con tres muestras se aumenta hasta más del 90% (3).

Debido a la excreción intermitente de los organismos, así como a la evolución hacia métodos más rápidos y automatizados, se han investigado procedimientos de diagnóstico alternativos, como la inmunofluorescencia indirecta (4), inmunodifusión y enzimoanálisis (5,6), que detectan el antígeno protozoario en las heces.

Estos procedimientos han mostrado una sensibilidad analítica comparable al examen microscópico, son bastante sencillos de realizar y no requieren la observación de organismos intactos (7-10).

El objetivo del presente estudio ha sido evaluar un enzimoanálisis de doble anticuerpo para la detección de quistes y trofozoitos de *Giardia lamblia* en heces. Este procedimiento incorpora el complejo estreptavidina-biotina para incrementar la sensibilidad analítica, es rápido y sencillo de realizar, permitiendo analizar un alto número de muestras en poco tiempo.

Laboratorio C.E. Dr. Quesada Sanz. Servicio de Análisis Clínicos.
H.U. Virgen de la Arrixaca. Murcia.
Recibido: 14-10-96
Aceptado: 8-5-97

Material y métodos

Instrumentación y reactivos

El estudio se realizó utilizando un enzimoimmunoanálisis de doble anticuerpo tipo «sandwich» en microplaca, con amplificación de señal mediante el complejo estreptavidina-biotina (Chemicon, Chemicon International, Inc., Temecula, EEUU; ref.: 3215).

El método consiste en la formación de un complejo durante la primera incubación entre los antígenos de *Giardia lamblia* presentes en el sobrenadante de las heces y anticuerpos policlonales contra la *Giardia lamblia* unidos a las paredes del pocillo. Posteriormente, se añade un nuevo anticuerpo policlonal contra la *Giardia lamblia* que se une en forma «sandwich» a los antígenos del parásito tras una nueva incubación. Las siguientes dos incubaciones amplifican la señal por medio del complejo de reacción biotina-estreptavidina-peroxidasa de rábano picante, al añadir un anticuerpo contra el segundo anticuerpo mencionado conjugado a biotina y estreptavidina-peroxidasa de rábano picante. Después de lavar, para eliminar la enzima no ligada al complejo, se añade un sustrato cromógeno, azul de Thimerosal, que desarrolla un color azul en presencia del complejo enzimático y peróxido de hidrógeno. La solución de parada, ácido fosfórico, termina la reacción y cambia el color azul a amarillo.

Las absorbancias desarrolladas se midieron en un lector de placa EIA 400 FW READER (Whittaker) con un filtro de 450 nm, considerando positivas aquellas lecturas iguales o superiores a 0,25 unidades de absorbancia y negativas las inferiores a esta cifra, según las instrucciones del fabricante. El equipo incluía un control negativo y otro positivo.

Población estudiada y especímenes

Se analizaron 46 muestras de heces recibidas en nuestro laboratorio para investigación de *Giardia lamblia*. Estas muestras provenían de un área sanitaria compuesta en un 80% por centros de Atención Primaria, y fueron en su mayoría de población adulta. En primer lugar, las heces fueron sometidas a examen microscópico directo en fresco, observando una suspensión en solución salina teñida con lugol. De las 46 analizadas, en 32 de ellas se observaron quistes de *Giardia lamblia*, solos o en presencia de huevos de *Enterobius vermicularis*. Las 14 heces restantes fueron seleccionadas para el estudio por la observación microscópica de otros parásitos intestinales, como *Enterobius vermicularis*, *Entamoeba coli* y *Chilomastix mesnili*.

Las heces se congelaron a -20°C hasta su análisis. Una vez descongeladas se preparó una dilución 1:5 mediante 1 g aproximado de heces y 4 mL de la solución amortiguadora incluida en el envase de reactivos, utilizando el sobrenadante para realizar el inmunoanálisis.

Análisis estadístico

Para valorar la utilidad diagnóstica del inmunoanálisis estudiado utilizamos los parámetros de sensibilidad y especificidad diagnósticas. Para corregir la variación de estos parámetros según la población estudiada calculamos los valores predictivos positivo y negativo en función de la prevalencia de la enfermedad en la población atendida por nuestro laboratorio, aplicando el teorema de Bayes (11,12).

Para el cálculo de la prevalencia de giardiasis en nuestra área de salud utilizamos los resultados obtenidos en 1025 muestras de heces analizadas por microscopía óptica en nuestro laboratorio durante el año 1995.

Para valorar la dependencia estadística de la absorbancia medida en el sobrenadante de las heces frente al número de

quistes por campo en una suspensión de la muestra observada al microscopio óptico utilizamos la prueba *t* de Student-Fisher.

Resultados

Del total de 46 muestras analizadas, 33 fueron positivas (absorbancia superior a 0,25) y 13 negativas (absorbancia inferior a 0,25). De las 33 primeras en 2 de ellas no se habían observado quistes de *Giardia lamblia* al microscopio, aunque sí de *Entamoeba coli* y *Chilomastix mesnili*, respectivamente. Por otra parte, en 1 de las 13 muestras negativas para el inmunoanálisis observamos quistes de *Giardia lamblia* al microscopio (figura 1).

Con estos datos obtuvimos unos porcentajes de sensibilidad y especificidad diagnóstica de 96,87 y 85,71%, respectivamente. Los valores predictivos positivo y negativo se calcularon en función de la prevalencia de giardiasis en nuestra área de salud (3,32%), y fueron 18,88 y 99,87%, respectivamente.

Para valorar la capacidad como método semicuantitativo del inmunoanálisis estudiado, separamos las muestras analizadas

		Enzimoimmunoanálisis		
		+	-	Total
Microscopio óptico	+	31	1	32
	-	2	12	14
Total		33	13	46

Figura 1. Clasificación de las muestras de heces según los procedimientos aplicados. Las muestras positivas para giardiasis por microscopía óptica fueron todas aquellas en las que observamos al menos un quiste de *Giardia lamblia* en la preparación.

en 3 grupos según el número de quistes de *Giardia lamblia* por campo que observamos al microscopio óptico (figura 2). El grupo A lo formaron las heces con escasos quistes (0-2/campo) del parásito ($n = 6$). El grupo B contenía las muestras con algunos quistes (2-5/campo) de *Giardia lamblia* ($n = 15$) y el grupo

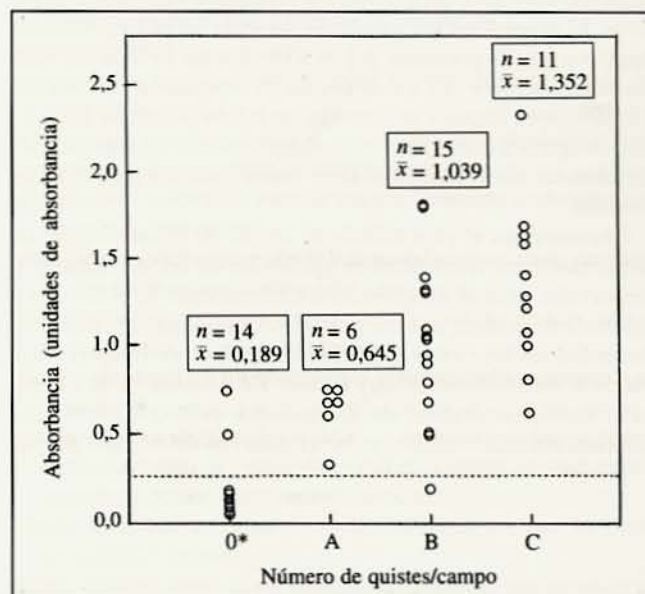


Figura 2. Absorbancia medida en el sobrenadante de las heces en función del número de quistes por campo en una suspensión de la muestra observada al microscopio óptico. *El grupo 0 incluye todas las muestras en las que no se observó ningún quiste de *Giardia lamblia* en toda la preparación.

C lo formaron las heces con abundantes ($> 5/\text{campo}$) microorganismos ($n = 11$). Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A y B y los grupos A y C, que fueron casi significativas entre los grupos B y C ($P = 0,05$).

Discusión

El procedimiento estudiado utiliza el sistema estreptavidina-biotina. Este sistema aprovecha la interacción no covalente de alta afinidad existente entre la avidina y la biotina para aumentar la sensibilidad analítica, a la vez que consigue, dado el alto grado de inmovilización del complejo formado, un medio de reacción estable e inalterable por factores externos, como el proceso de lavado o cambios en el pH del medio (13). Este sistema posibilita una alta sensibilidad diagnóstica, 96,87%, aunque con una especificidad diagnóstica inferior, 85,71%, debida al hecho de que una muestra con quistes de *Entamoeba coli* y otra de *Chilomastix mesnili* fueran consideradas positivas por el inmunoanálisis. Estos porcentajes de sensibilidad diagnóstica son similares a los obtenidos para otros inmunoanálisis. Así, el enzimoanálisis comercial ProSpecT Giardia Rapid Assay, presenta valores del 94-95% (5,14), que parece incluso aumentar con la inmunofluorescencia directa (15). Sin embargo, la especificidad diagnóstica obtenida es ligeramente inferior a la observada en la bibliografía, que se encuentra entre el 95 y el 100% en los procedimientos evaluados (5,14,15). En nuestro caso bajó a 85,71%, quizá debido a que en ninguno de los trabajos revisados incluían entre las muestras negativas ninguna que presentara otros parásitos intestinales.

La prevalencia de giardiasis en nuestro medio fue del 3,32%, inferior a la referida por otros autores (14,16). Esto lo atribuimos a las características peculiares de la población estudiada en estos trabajos, que en muchos casos era infantil (16), mientras que nuestra área de salud está principalmente compuesta por centros de Atención Primaria, con predominio de la población adulta. Además, en nuestro estudio la observación microscópica de las heces se realizó en fresco sin concentración previa de la muestra. Esto podría haber afectado a la prevalencia, sobre todo en aquellas heces con poca cantidad de quistes, más difíciles de detectar en preparaciones directas.

La baja prevalencia de la enfermedad en nuestro medio hace aconsejable utilizar un procedimiento con un valor predictivo negativo muy alto, para evitar los resultados falsamente negativos. El procedimiento estudiado presenta un valor predictivo negativo para la giardiasis del 99,87%, lo cual lo hace útil para nuestro objetivo. El valor predictivo positivo es sólo del 18,88%; esto implica un número de falsos positivos elevado que obligaría a comprobar microscópicamente las muestras seleccionadas por el inmunoanálisis como positivas para *Giardia lamblia*.

Encontramos el procedimiento objeto de estudio capaz de semicuantificar la cantidad de quistes en las heces. Aunque lo importante para el diagnóstico es únicamente la presencia o ausencia de quistes, existen portadores asintomáticos de la enfermedad, en los cuales el número de quistes por campo observados al microscopio es muy escaso. En estos casos, la valoración semicuantitativa de la muestra podría darnos una información más completa sobre el grado de infestación del pa-

ciente. No obstante, desconocemos en nuestra serie el número de enfermos y portadores de giardiasis, por lo que consideramos conveniente realizar un trabajo que estudie la relación entre la concentración de quistes en la muestra y la gravedad de la enfermedad.

Por último, el procedimiento analizado es sencillo y rápido de realizar. Todo esto lo hace útil como método de cribado en aquellos centros con un alto número de muestras —en los que el ahorro de tiempo y personal se hace considerable—, y en zonas con una baja prevalencia de la enfermedad. No obstante, consideramos imprescindible la observación al microscopio, tanto para confirmar todos los resultados positivos por el inmunoanálisis como para investigar la presencia de cualquier otro tipo de parásitos.

Correspondencia:
M.ª D. Albaladejo Otón
Laboratorio C.E. Dr. Quesada Sanz
Plaza Dr. Quesada Sanz s/n
30005 Murcia

Bibliografía

1. Black R. Giardiasis in Day-Care Centers: Evidence of Person to Person Transmission. *Pediatrics* 1977; 60: 486-91.
2. Craun G. Waterborne Giardiasis in the United States. *Lancet* 1986; 513-4.
3. Naik SR, Rau NR, Vinayak VK. A comparative evaluation of three stool samples, jejunal aspirate and jejunal mucosal impression smears in the diagnosis of giardiasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1978; 72: 491-2.
4. Rojas I, Torres DR, Mendiola BJ, Finlay CM. Detection of specific anti-giardia serum antibody by an immunofluorescence test in children with clinical giardiasis. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40: 477-9.
5. Rossoff JD, Sanders CA, Sonnad SS et al. Stool diagnosis of giardiasis using a commercially available enzyme immunoassay to detect Giardia-specific antigen 65. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1997-2002.
6. Stibbs HH. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for *Giardia lamblia* antigen in human stool. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2582-8.
7. Allison MC. A Microscopic and Immunodiagnostic Search for Giardiasis in Patients with Gastrointestinal Disorders. *Scan J Gastroenterol* 1988; 23: 209-12.
8. Nash T, Herrington D, Levine M. Usefulness of an Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detection of Giardia Antigen in Feces. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1169-71.
9. Green E, Miles M, Warhurst D. Immunodiagnostic Detection of Giardia Antigen in Faeces by a Rapid Visual Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Lancet* 1985; 691-3.
10. Ungar B. Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Detection of *Giardia lamblia* in Fecal Specimens. *J Infect Dis* 1984; 149: 90-7.
11. Pozo F. La eficacia de las pruebas diagnósticas (I). *Med Clin (Barc)* 1988; 90: 779-85.
12. Pozo F. La eficacia de las pruebas diagnósticas (II). *Med Clin (Barc)* 1988; 91: 177-83.
13. Diamandis EP, Christopoulos TK. The Biotin-(Strept)Avidin System: Principles and Applications in Biotechnology. *Clin Chem* 1991; 37: 625-36.
14. Scheffler EH, van Etta LL. Evaluation of rapid commercial enzyme immunoassay for detection of *Giardia lamblia* in formalin-preserved stool specimens. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1807-8.
15. Zimmerman SK, Needham CA. Comparison of conventional stool concentration and preserved-smear methods with *Merifluor Cryptosporidium/Giardia* Direct Immunofluorescence Assay and ProSpecT Giardia EZ Microplate Assay for detection of *Giardia lamblia*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1942-3.
16. Martín AM, Rodríguez J, Canut A, Dovigo CA. Evaluación de una técnica inmunoenzimática para la detección en heces de antígeno de *Giardia intestinalis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1992; 10:39-42.