

ELISA y técnica de sedimentación espontánea para el diagnóstico de infección por *Giardia lamblia* en muestras fecales de niños de Perú

Claudia Rodríguez-Ulloa, MBlga, D en C Biol.^(I) Marco Rivera-Jacinto, MBlgo, D en C Biol.^(I)

Rodríguez-Ulloa C, Rivera-Jacinto M.

ELISA y técnica de sedimentación espontánea para el diagnóstico de infección por *Giardia lamblia* en muestras fecales de niños de Perú.
Salud Pública Mex 2011;53:516-519.

Resumen

Objetivo. Comparar un kit ELISA comercial para coproantígenos y la técnica de sedimentación espontánea en tubo (TSET) para el diagnóstico de *Giardia lamblia* en muestras fecales de niños de una zona endémica peruana. **Material y métodos.** Fueron analizadas 174 muestras mediante la TSET y el kit *Giardia 2nd Generation ELISA*. **Resultados.** Fueron positivas 51 muestras por ELISA y 49 por TSET. **Conclusiones.** El ELISA resultó ser altamente sensible y específico, sencillo y rápido; sin embargo, la muy buena concordancia, alta precisión, bajo costo y capacidad para detectar otros enteroparásitos hace que la TSET sea recomendable para el diagnóstico en zonas endémicas del Perú.

Palabras clave: *Giardia lamblia*; prueba ELISA; diagnóstico de laboratorio; Perú

Rodríguez-Ulloa C, Rivera-Jacinto M.

ELISA and spontaneous sedimentation technique for the diagnosis of *Giardia lamblia* infection in stool samples of Peruvian children.
Salud Pública Mex 2011;53:516-519.

Abstract

Objective. To compare a commercial coproantigen ELISA kit and the technique of spontaneous sedimentation in tube (TSET) for the diagnosis of *Giardia lamblia* in fecal specimens from children in a Peruvian endemic area. **Material and methods.** 174 fecal samples were analyzed by TSET and 2nd Generation *Giardia* ELISA kit. **Results.** 51 samples were positive by ELISA and 49 by TSET. **Conclusions.** The ELISA was highly sensitive and specific, simple and fast. However, the very good agreement, high precision, low cost and ability to detect other intestinal parasites makes use of TSET recommended for laboratory diagnosis in endemic areas of Peru.

Key words: *Giardia lamblia*; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; laboratory techniques and procedures; Peru

La infección por *Giardia lamblia* afecta aproximadamente a un billón de personas en países en desarrollo;¹ en Perú la giardiasis es endémica y progresiva, con mayor frecuencia en niños.²

El diagnóstico tradicional implica el hallazgo de trofozoitos y quistes en heces, siendo el examen microscópico directo la técnica más empleada³ con

la que examinan al menos tres muestras, o utilizan técnicas de concentración para que los quistes en caso número no pasen inadvertidos.⁴ La necesidad de métodos rápidos y sencillos ha permitido el desarrollo de enzimoinmunoanálisis (ELISA) para la detección de coproantígenos de *G. lamblia*, disponibles comercialmente.

(I) Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Cajamarca. Perú.

Fecha de recibido: 24 de febrero de 2011 • **Fecha de aceptado:** 30 de agosto de 2011

Autor de correspondencia: M Cs Marco Rivera-Jacinto. Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Cajamarca.

Av. Atahualpa 1050, Carretera Baños del Inca. Cajamarca, Perú.

Correo electrónico: mrivera@unc.edu.pe

El objetivo del estudio fue comparar un kit ELISA comercial para coproantígenos y la técnica de sedimentación espontánea en tubo (TSET) para el diagnóstico de giardiasis en niños de una zona endémica de Perú.

Material y métodos

El protocolo de investigación fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Nacional de Trujillo. Durante abril a junio de 2010, con consentimiento informado de los padres, se colectaron 174 muestras fecales de niños entre tres y doce años de edad procedentes del distrito Los Baños del Inca (2 665 msnm), Cajamarca, Perú. Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Parasitología de la Universidad Nacional de Cajamarca.

Una porción de cada muestra se conservó en formaldehído al 10% hasta su evaluación por TSET, llevada a cabo por una sola persona con amplia experiencia.⁵ El resultado fue positivo ante el hallazgo de quistes y/o trofozoitos de *Giardia*. Otra porción más pequeña fue conservada a -20 °C hasta su análisis con *Giardia 2nd Generation ELISA* (Sensibilidad: 75.80%, especificidad: 99.30%). Los resultados se leyeron visualmente y con lector de ELISA a 450 nm. Se consideró positiva una densidad óptica (DO) igual o mayor a 0.17. En la escala visual, los resultados se consideraron negativos (-, +) y positivos (+++, ++++) según la intensidad del color de la reacción. Los padres y el director del centro de salud del distrito fueron informados de los resultados; los escolares con parásitos patógenos fueron evaluados por médicos quienes prescribieron el tratamiento respectivo.

Resultados

De las 174 muestras, 51 fueron positivas a *G. lamblia* por ELISA (29.3%) y 49 por TSET (28.2%). Entre las primeras, que según la intensidad de color incluyeron 17 resultados con ++ y 34 con +++, siete fueron negativas por TSET. Entre los positivos por TSET hubo cinco negativos por ELISA, los negativos para ELISA tuvieron DO por debajo del punto de corte. 118 muestras fueron negativas tanto por ELISA como por TSET (108 con - y 10 con +). Siete de las muestras negativas con TSET fueron positivas con ELISA (cinco con ++ y dos con +++) (cuadro I).

De las 125 muestras negativas por TSET, 82 tuvieron otros enteroparásitos: *Entamoeba coli* (47), *Entamoeba sp.* (24), *Iodamoeba butschlii* (16), *Endolimax nana* (55), *Chilomastix mesnili* (26), *Ascaris lumbricoides* (4) e *Hymenolepis nana* (4); 53 niños presentaron más de un parásito.

Cuadro I

COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR TSET Y KIT ELISA EN 174 MUESTRAS FECALES. LOS BAÑOS DEL INCA, CAJAMARCA, PERÚ, ABRIL-JUNIO 2010

ELISA	TSET		
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	44	07	51
Negativos	05	118	123
Total	49	125	174

Fuente: Fichas de diagnóstico de laboratorio

El índice kappa para los resultados de ambas técnicas fue 0.83 (IC 95% 0.74-0.92) con clasificación de concordancia muy buena. El ELISA tuvo 89.8% de sensibilidad (IC 95% 80.3-99.3) y 94.4% de especificidad (IC 95% 90.0-98.8).

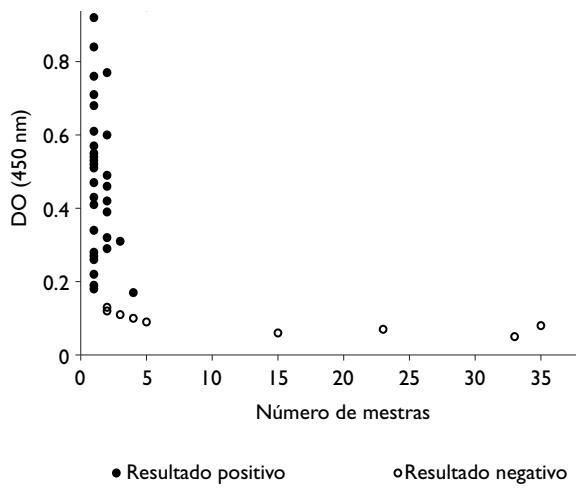
Los valores de absorbancia de los negativos oscilaron entre 0.05 a 0.14, con una media de 0.07; los valores DO para los casos positivos estuvieron en un rango de 0.17 a 0.97, con una media de 0.49 (figura 1).

Discusión

La TSET es sencilla, económica y altamente sensible para el diagnóstico de varios parásitos intestinales, así lo demuestran algunos estudios comparativos con técnicas como el examen directo y las concentraciones de Faust, Ritchie, Sheater, etc.^{6,7} de allí que se recomienda como método rutinario de diagnóstico de enteroparásitos.⁷

El test de kappa mostró muy buena concordancia cuando comparamos los resultados de TSET con ELISA. De hecho, emplear técnicas de concentración para el diagnóstico de *Giardia* en muestras fecales posee muy alta sensibilidad y especificidad, similares al de ELISA; así lo demuestra un estudio donde la sensibilidad y especificidad de una técnica de concentración fue de 98.7 y 100% frente a 98.9 y 100% de un ELISA, respectivamente.⁸

Los cinco casos positivos por TSET y negativos por ELISA pueden corresponder a falsos positivos debido a error del observador, ya que aun cuando fuera experimentado, siempre existe la posibilidad de fallar en la identificación, especialmente de formas quísticas.⁹ Este problema también se ve en casos de baja densidad parasitaria o por ausencia de formas parasitarias intactas o completas.¹⁰ Sin embargo, el empleo de TSET traduce



Fuente: Ficha de datos emitidos por lector de placas ELISA

FIGURA 1. DENSIDAD ÓPTICA DE 174 MUESTRAS FECALES ANALIZADAS MEDIANTE EL KIT ELISA. LOS BAÑOS DEL INCA, CAJAMARCA, PERÚ, ABRIL-JUNIO 2010

mejor el índice parasitario en estudios epidemiológicos porque detecta parásitos en donde aún no tienen kits de diagnóstico rápido.

Otras investigaciones comparan el examen directo con el ELISA y determinan que esta última posee sensibilidad de 76.4 a 84.0% y especificidad superior a 95.0%.^{11,12} Las variaciones de sensibilidad y especificidad de estos métodos se deberían a la variabilidad genética de las cepas circulantes en diferentes zonas. De allí que algunos países han desarrollado estuches comerciales de ELISA con anticuerpos específicos para cepas locales con sensibilidades de hasta 100%.¹³

El ELISA empleado mostró mayor sensibilidad que la indicada por el fabricante, pero su especificidad disminuyó; pese a esto, quedó demostrado que estos kits son capaces de detectar mínimas cantidades de antígenos aun cuando la densidad parasitaria sea mínima, debido a que la inmunodetección de coproantígenos está basada en el empleo de anticuerpos monoclonales o policlonales que reconocen específicamente productos parasitarios de secreción, de superficie o somáticos.¹⁴ Sin embargo, se prefieren kits con anticuerpos policlonales porque han mostrado mayor sensibilidad, aun cuando pueden aumentar los problemas de reacciones inespecíficas o de reacción cruzada con otros parásitos intestinales, a pesar de que la mayoría de antígenos son lábiles en fijadores convencionales de laboratorio utilizados para la recolección, transporte y almacenamiento de muestras fecales.¹⁵

Otras ventajas del ELISA es que no requiere personal experimentado para su desarrollo, es rápido, de fácil interpretación, posibilita el cribado de gran número de muestras, es de interés en estudios epidemiológicos y reconoce la infección en curso en heces recientes o conservadas. No obstante, es más caro que los métodos tradicionales.¹⁴

Además de tener alta sensibilidad y especificidad, el ELISA se recomienda para estudios epidemiológicos por ser una prueba sencilla y rápida para evaluar una gran cantidad de muestras; sin embargo, la muy buena concordancia con ELISA, alta precisión, bajo costo y capacidad para detectar otros enteroparásitos comunes, hace que el uso de TSET sea altamente recomendado para el diagnóstico de laboratorio en zonas endémicas de países en desarrollo, como Perú.

Agradecimiento

Nuestro agradecimiento al Dr. Pedro Ortiz Oblitas por su desinteresada colaboración en la realización de las pruebas.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declararon no tener conflicto de intereses.

Referencias

1. World Health Organization. The World Health Report 1996. Fighting Disease Fostering Development. Geneva: World Health Organization, 1996.
2. Alarcón J, Castro C, Murillo J. Prevalencia de giardiasis en encuestas parasitológicas publicadas en la literatura peruana, 1943-1990. Rev Per Epid 1993; 6: 5-17.
3. Botero D, Restrepo M. Parasitosis humanas. 4º ed. Bogotá: Corporación para Investigaciones Biológicas, 2006.
4. Núñez FA. *Giardia lamblia*. En: Llop A, Valdés-Dapena M, Zuazo JL, eds. Microbiología y Parasitología Médicas. Vol.3. La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 2001:31-38.
5. Casanova RT, Ramos MC. Técnicas de diagnóstico de enfermedades causadas por enteroparásitos. Diagnóstico 2000;39:197-198.
6. Pajuelo-Camacho G, Luján-Roca D, Paredes-Pérez B, Tello-Casanova R. Aplicación de la técnica de sedimentación espontánea en tubo en el diagnóstico de parásitos intestinales. Ver Biomed 2006; 17: 96-101.
7. Terashima A, Marcos L, Maco V, Canales M, Samalvides F, Tello R. Técnica de sedimentación en tubo de alta sensibilidad para el diagnóstico de parásitos intestinales. Rev gastroenterol Perú 2009; 29: 305-310.
8. Chakarova B. Comparative evaluation of the diagnostic methods for detection of *Giardia intestinalis* in human fecal samples. TJS 2010;8:174-179.
9. Vidal AMB, Catapani WR. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. São Paulo Med J 2005; 123:282-285.
10. Weitzel T, Ditttrich S, Mohl S, Adusu E, Jelinek T. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 656-659.
11. Vidal MF, Gilman RH, Ungar BLP, Verastegui MR, Benel AC, Marquis G, et al. Detection of *Giardia lamblia* antigen in children living in a peruvian periurban shantytown. J Clin Microbiol 1991;29:636-637.

12. Al-Saeed AT, Issa SH. Detection of *Giardia lamblia* antigen in stool specimens using enzyme-linked immunosorbent assay. EMHJ 2010; 16: 362-364.
13. Duque-Beltrán S, Nicholls-Orejuela RS, Arévalo-Jamaica A, Guerrero-Lozano R, Montenegro S, James MA. Detection of *Giardia duodenalis* antigen in human fecal eluates by enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal antibodies. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2002; 97: 1165-1168.
14. Corripio IF, Cisneros MJG, Ormaechea TG. Diagnóstico de las parasitosis intestinales mediante detección de coproantígenos. Enferm Infect Microbiol Clin 2010; 28:33-39.
15. Rosoff JD, Sanders CA, Sonnad SS, De Lay PR, Hadley WK, Vincenzi FF, et al. Stool diagnosis of giardiasis using a commercially available enzyme immunoassay to detect *Giardia*-specific Antigen 65 (GSA 65). J Clin Microbiol 1989; 27:1997.