

## **Detección de coproantígenos de giardia lamblia mediante un sandwich ELISA estandarizado en Cuba**

### **Detection of giardia lamblia coproantigens using a standardized ELISA sandwich in Cuba**

Lemis Dueñas Rosquete (1), Ana Adis Arencibia Díaz (2), Omar Tomey Méndez.

#### **Resumen**

Se realizó un estudio parasitológico a niños de la escuela primaria "José A. Echevarría" del municipio Ciego de Ávila, cuyas edades se encontraban entre 5 y 11 años, para conocer el comportamiento de *Giardia lamblia*. En todos los casos se recogieron 3 muestras de heces, a las cuales se les aplicaron los métodos de concentración de Ritchie (fórmol-éter) y el ensayo inmunoenzimático en fase sólida para la detección de coproantígenos de *G. lamblia* normalizado en el laboratorio de Parasitismo Intestinal del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Se determinaron los valores de sensibilidad y especificidad del ELISA, los cuales fueron de 100 % y 88,75 % respectivamente. No se observaron reacciones cruzadas con muestras de heces positivas a otros parásitos. Estos resultados reafirman el valor diagnóstico del ELISA utilizado.

**Palabra clave:** Giardia lamblia.

1. Especialista de primer grado en Microbiología. Master en Parasitología.
2. Especialista de primer grado en Microbiología Especialista de primer grado en Medicina General Integral.
3. Estudiante de cuarto año de Medicina.

#### **INTRODUCCION**

*Giardia lamblia* es el protozoo intestinal que con mayor frecuencia se identifica en la especie humana, principalmente en los niños, aunque puede presentarse en personas de cualquier edad, fenómeno que ocurre tanto en nuestro país como en otros países tropicales y subtropicales(1-3).

El diagnóstico de *G.lamblia* se realiza mediante el examen directo de heces donde se pueden encontrar quistes y/o trofozoítos, el examen de una muestra simple es capaz de detectar solamente entre el 30 % y el 50 % de los casos(4) esto se debe en parte a que el examen se realiza después de horas de la deposición, lo que imposibilita la observación de trofozoitos debido a su destrucción, y en el caso de los quistes es conocido que su excreción tiene un patrón intermitente, existiendo gran variación en el número de los mismos en las muestras(5). En cambio, estos resultados pueden ser ampliamente mejorados con el examen de muestras seriadas y la utilización de técnicas de concentración (6).

Puede acudir al análisis del líquido duodenal obtenido por aspiración o por medio de la cápsula de Enterotest, y la observación directa del tejido mucoso del intestino delgado obtenido por biopsia. Estos son métodos muy invasivos para el paciente por lo que su uso queda limitado a aquellos casos en que exista la sospecha clínica de giardiosis y no se halla demostrado la presencia del parásito por examen directo(7). Los métodos de cultivo "in vitro" para la obtención de antígenos de *G. lamblia*, han permitido el desarrollo de técnicas para la detección de anticuerpos. Esto tiene desventajas relacionadas con la variabilidad en la respuesta inmune humoral del paciente, a que en ocasiones se mantienen los títulos

aún después de ser eliminada la infección y a que se pueden presentar reacciones cruzadas con otros parásitos. Dentro de dichas técnicas se encuentran:

- Inmunodifusión(7).
- hemaglutinación indirecta(8).
- inmunofluorescencia indirecta(8).
- radioinmunoensayo (9).
- ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA)(10).

Diversos laboratorios han desarrollado técnicas de inmunodiagnóstico para la detección de antígenos de *G.lambli*a en heces, muchos de los cuales se encuentran disponibles comercialmente(11,12). Algunos autores han evaluado la utilidad de estos sistemas para estudios clínicos y epidemiológicos. En 1993 Rosenblatt y col(13), realizaron un estudio utilizando un sandwich ELISA en muestras de exámenes diarios del laboratorio de parasitismo intestinal de la clínica Mayo. En el mismo año Goldin y col(12) aplicaron una técnica similar en niños infectados con *G. lambli*a en Bangladesh, mientras que Jelinek y col en1996(14) utilizaron uno de estos sistemas para determinar la prevalencia de este protozooario en viajeros que regresaban de zonas endémicas. En nuestro caso empleamos una técnica de sandwich ELISA normalizada y validada en nuestra institución(15), con el objetivo de conocer la utilidad de la misma en estudios epidemiológicos.

En los últimos años los esfuerzos en el campo del inmunodiagnóstico de *G.lambli*a se han encaminado hacia la normalización de ensayos que detecten antígenos del parásito, esto es muy relevante, pues permite detectar la infección activa. Los más empleados han sido los ELISA, cuyo primer reporte publicado fue en 1981(16) con valores de sensibilidad y especificidad de 92,0 % y 98,0 % respectivamente. A partir de ese momento los ensayos inmunoenzimáticos han sido reportados con éxito para el diagnóstico de esta parasitosis. Estudios recientes demuestran que esta técnica para la detección de coproantígenos, en una sola muestra, puede ser más sensible que el examen microscópico seriado. Scheffer y Evans(17) reportaron un ELISA con un 26 % de sensibilidad por encima del examen microscópico convencional.

Con el presente trabajo se pretende contribuir a demostrar la validez de la realización del método inmunoenzimático para la detección de coproantígenos de *G.lambli*a y demostrar la necesidad de estudiar un mayor número de muestras de heces para mejorar el diagnóstico de este protozooario.

## **MATERIALES Y METODOS**

Las muestras fueron tomadas y examinadas durante los meses de mayo y junio del 2001. A cada niño se le entregó 3 frascos plásticos con tapa de presión, limpios, secos y sin preservativos, previamente rotulados con el nombre del niño y el grupo al que pertenecía.

Las muestras se recolectaron en días alternos por defecación espontánea. Estas fueron procesadas en el laboratorio de Microbiología del Hospital Provincial "Antonio Luaces Iraola" de Ciego de Avila para lo cual se empleó el método de conservación en formol al 10%. En el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" se realizó el estudio de estas muestras previamente procesadas, aplicando en todos los casos un examen seriado de heces (3 muestras), utilizando el método copoparasitológico de concentración de Ritchie y el ELISA de doble anticuerpo para la detección de coproantígenos de *G. lambli*a, siendo considerados como verdaderos positivos sólo aquellos que presentaban quistes y/o trofozoitos al examen copoparasitológico.

Los casos que al examen seriado de tres muestras resultaron negativos a *G.lambli*a por examen microscópico después de aplicarse la concentración de Ritchie y fueron positivos por la técnica de ELISA, se les continuó el estudio seriado hasta completar seis muestras.

Para el ELISA se tomó 1 gramo de cada muestra y se diluyó en solución 2 ml de solución salina tamponada con fosfato 0.1M pH 7.2 - 7.4 la cual contenía Tween 20 al 0,05 % (SSTF-T20). Se centrifugó a 600g durante 20 minutos y el sobrenadante se almacenó en alícuotas de 1 ml a -70°C hasta su uso.

ELISA de doble anticuerpo(15) :

Las placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Nunc-Maxisorp F8) fueron sensibilizadas con 100 l por pocillo de IgG específica anti *G.lambli*a a 20 g / ml en tampón carbonatobicarbonato 0.05M pH 9.6 y se incubaron a 4°C durante 16 horas. Posteriormente se lavaron 6 veces con SSTF-T20 y los espacios no recubiertos por la IgG se bloquearon con 300 l por pocillo de leche descremada al 5% en SSTF-T20, durante 1 hora a 37°C. Se desechó la leche y se añadieron 100 l de la muestra procesada, se incubaron 2 horas a temperatura ambiente (TA) luego se realizó otro paso de lavado similar al anterior. Se añadió 100 l por pocillo del conjugado anti *G.lambli*a obtenido en el laboratorio, a la dilución de 1/1000 en SSTF-T20, con un 20% de suero de conejo. Las placas se incubaron 1 hora a 37°C y a esto siguió otro paso de lavado.

La reacción se reveló adicionando la solución de sustrato: 20mg de Ortofenilendiamina (Merck), 20 l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, 50 ml de tampón citrato fosfato pH 5.0, dejándolo reaccionar durante 30 minutos a TA, en oscuridad. Para detener la reacción se adicionó 50 l en cada pocillo de solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 12.5% y se leyó a un de 492 nm, utilizando un lector de micro ELISA (Organon Teknica nv, OT-510, Austria).

En cada ensayo se incluyeron controles positivos y negativos a *G.lambli*a consistentes en muestras previamente conocidas.

Para calcular la especificidad (E), la sensibilidad (S), el valor predictivo de una prueba positiva [Vp(+)] y el valor predictivo de una prueba negativa [Vp(-)] tomando como referencia el método coproparasitológico de concentración de Ritchie.

Tomamos como criterio definitivo de infección el examen microscópico, por tanto, los casos que resultaron positivos por la técnica de ELISA y negativos por el examen microscópico fueron considerados "falsos positivos" y los que resultaron negativos por la técnica de ELISA y positivos por examen microscópico fueron considerados "falsos negativos".

## RESULTADOS Y DISCUSION

De un total de 240 niños estudiados por el método coproparasitológico de concentración de Ritchie y por la técnica de sandwich ELISA, 80 casos resultaron positivos a *G.lambli*a por examen microscópico, después de aplicar dicha técnica de concentración para un 33,3% y 98 resultaron positivos por la técnica de ELISA, para un 40,8%. Detectamos un predominio de este protozoo en los grados primero y segundo, es decir los niños comprendidos en las edades más bajas entre 5 y 7 años, sin presentar predilección por uno u otro sexo, resultados que coinciden con la bibliografía revisada.

Se ha planteado que el examen de una sola muestra, no descarta la posible existencia de un parasitismo en caso de ser negativa, pues es conocido en diferentes infecciones parasitarias, la aparición de fases negativas, durante las cuales, no se expulsan al exterior quistes, huevos o larvas(1,2). En nuestro trabajo demostramos que el estudio de varias muestras fecales, 6 en nuestro caso, aumentan notablemente las posibilidades de identificar parásitos. Marti y col en 1993(18)

emplearon un modelo matemático para probar la relación entre el número de muestras para diferentes parásitos intestinales y la frecuencia de falsos negativos, para esto realizaron un estudio con 1869 pacientes y demostraron como en el caso de *G.lambliia* existe una relación de proporcionalidad inversa entre el número de muestras y el porcentaje de falsos negativos. Esto se corresponde con los resultados de nuestro estudio, pues comprobamos como de una tercera a una sexta muestra (22,9% vs 33,3%) aumentó el hallazgo de nuevos casos que habían sido negativos con la utilización de una sola muestra.

La técnica de ELISA empleada presentó una especificidad de 76,75% en el estudio seriado de tres muestras, valor inferior en comparación al obtenido al concluir el estudio de seis muestras (88,75%). Este aumento del valor de la especificidad del ELISA, se debió al estudio de un mayor número de muestras, lo cual permitió diagnosticar mayor cantidad de casos positivos mediante el examen microscópico. Debemos señalar que esta especificidad pudiera haber sido más elevada, pues cuatro niños que resultaron "falsos positivos" no se les pudo extender el estudio hasta las seis muestras por ser trasladados del centro lo que interfiere en el valor definitivo de este parámetro. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Jelinek y col(14), al coleccionar tres muestras adicionales a 10 de sus 12 casos falsos positivos, de los cuales 9 resultaron positivos por examen microscópico. Por tanto podemos concluir que la realización de un seriado de tres muestra de heces, frecuentemente resulta insuficiente para detectar la presencia o ausencia de *G.lambliia* , haciéndose necesarias seis o más muestras.

La sensibilidad y especificidad de nuestra técnica fue elevada (100% y 88,75%) respectivamente, valores que se corresponden con los obtenidos por otros autores, Green y col en 1985<sup>19</sup> obtuvieron valores de 94,2% y 98,0% de sensibilidad y especificidad respectivamente. Goldin y col en 1993(12) de 94,2% y 98,0% y Rosenblatt y col(13) en este mismo año de 97,0% y 96,0%.

Al realizar un aumento en el número de muestras recogidas se elevó la especificidad del sandwich ELISA disminuyeron los casos "falsos positivos", lo que demuestra que con el examen seriado de tres muestras pueden escapar casos positivos al examen microscópico que la técnica de ELISA es capaz de detectar desde la primera muestra. No se puede descartar la posibilidad de que los casos que continuaron "falsos positivos", en realidad puedan estar infectados, pues el ELISA detecta antígenos solubles de *G.lambliia* aún en ausencia del parásito intacto, lo cual unido a la excreción errática de quistes, puede explicar la causa de que el ELISA sea positivo cuando la microscopía se mantiene negativa. Goldin(12) y Rosenblatt(13) obtuvieron resultados similares y afirman que este tipo de sistema es superior al diagnóstico realizado por examen microscópico, pues el ELISA tiene la posibilidad de detectar antígenos del parásito en heces mientras que el examen microscópico requiere la presencia íntegra del parásito. Otros autores recomiendan considerar estos casos como positivos y someterlos a tratamiento.

Con estos resultados de sensibilidad y especificidad corroboramos la utilidad de esta ELISA en estudios epidemiológicos, así como la importancia de exámenes seriados para el diagnóstico de *G. lambliia* al obtener un mayor número de casos positivos, mientras mayor fue la cantidad de muestras analizadas.

## **ABSTRACT**

A parasitologic study was done from May to June, 2001 to children studying in Primary School José Antonio Echeverría from Ciego de Avila municipality whose ages were among 5 and 11 years to know the behaviour of giardia lamblia. In all cases 3 heces samples were taken to which the Ritchie's concentrations methods and the inmunoenzimatic assay in solid phase to detect coproantigens of *G lamblia* normalized in the laboratory of intestinal parasitism of the Tropical Medicine Institute "Pedro Kouri" The values of ELISA's sensibility and especificity which were 100% and 88.75% respectively. This results reassure the diagnostic value of the ELISA used.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- Sanjurjo Gonzales E, Rodríguez M, Bravo JR, Finlay CM, Silva LC, Galivez MD et al. Encuesta Nacional de Parasitismo Intestinal. Cuba: Ministerio de Salud Pública; 1984. 111p.
- 2- Tellez A, Morales W, Riverat, Meyer E, Liura B, Linder E. Prevalence of intestinal parasites in the human population of Leon, Nicaragua. *Acta Trop* 1997; 66: 119-25.
- 3- Joyce T, McGuigan KG, Elmon MM, Conroy Rm. Prevalence of enteropathogens in stools of rural. Maasai children under five years of age in the Maasailand region of Kenyan Rift Valley. *East Afr Med* 1996; 73: 59-62.
- 4- Naik SR, Rau NR, Vinayak UK. A comparative evaluation of three stool samples, jejunal aspirate and jejunal mucosal impression smears in the diagnosis of giardiasis. *Am Trop Med Parasitol* 1978; 72: 491-2.
- 5- Vinayak UK, Jain P, Naik SR. Demonstration of antibodies in giardiasis using the immunodiffusion technique with *Giardia* cyst as antigen. *Ann Trop Med Parasitol* 1978; 72: 581-2.
- 6- Romia SA, Zakham AA, Kholy ES. Immunodiffusion, immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay in the serodiagnosis of giardiasis. *J Egypt Soc Parasitol* 1990; 20: 209-14.
- 7- Ganguly NR, Majahan R, Vasudev. Comparative evaluation of indirect hemagglutination and immunofluorescence test in serodiagnosis of giardiasis. *Indian J Med Res* 1981; 73(suppl): 111-3.
- 8- Roberts Thompson IC, Anders RF. Serum antibodies in adult with giardiasis (abstract). *Gastroenterology* 1981; 80: 1262.
- 9- Miotti PG, Gilman RH, Pickering LK, Ruiz Palacios G, Park HS, Yolken RH. Prevalence of serum and milk antibodies to *Giardia lamblia* in different populations of lactating women. *J Infect Dis* 1988; 152: 1025-31.
- 10- Goka AKJ, Rollton DDK, Mathan UI, Farthing MIG. Diagnosis of giardiasis by specific IgM antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Lancet* 1986; 2: 184-6.
- 11- Elkady IA, Smith DH, Hommel M. Early diagnosis of giardiasis by faecal antigen detection using capture ELISA in a cohort of children in the United Arab Emirates. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86: 520-1.
- 12- Goldin AJ, Hall A, Sarker RA, Warhurst DC, Miles MA. Diagnosis of *Giardia lamblia* infection in Bangladesh infant: faecal antigen capture ELISA. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87: 428-32.
- 13- Rosenblatt JE, Sloan LM, Schneider SK. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in stool specimens. *Diag Microbiol Infect Dis* 1993; 16: 337-41.
- 14- Jelinek T, Peyer G, Locher TH, Nothdurft HD. Giardiasis in travellers: evaluation of antigen capture ELISA for the detection of *Giardia lamblia* -antigen in stool. *Z Gastroenterol* 1996; 34: 237-40.
- 15- Torres D, Fernández M, Brito T, Finlay CM. Ensayo inmunoenzimático en fase sólida para la detección de antígenos de *Giardia lamblia*. *Rev Cub Med Trop* 1997; 49(1): 52-8.
- 16- Mank Tg, Zaat JO, Deelder AM, van Eijk JT, Polderman AM. Sensitivity of microscopy versus enzyme immunoassay in the laboratory diagnosis of giardiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 615-9.
- 17- Scheffer 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.
- 18- Marti H, Koella J. Multiple stool examinations for ova and parasites and rate of false-negative results. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 3044-5.
- 19- Green EL, Miles MA, Warhurst DC. Immunodiagnostic detection of *Giardia lamblia* antigen in faeces by a rapid visual enzyme-linked immunosorbent assay. *Lancet* 1985; 2: 691-3