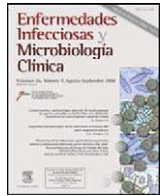


# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

## Evaluación de dos métodos inmunocromatográficos comerciales para el diagnóstico rápido de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. en muestras de heces

María José Gutiérrez-Cisneros<sup>a,\*</sup>, Rocío Martínez-Ruiz<sup>b</sup>, Mercedes Subirats<sup>c</sup>, Francisco Jesús Merino<sup>d</sup>, Rosario Millán<sup>b</sup> e Isabel Fuentes<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Majadahonda, Madrid, España

<sup>b</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, España

<sup>c</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Carlos III, Madrid, España

<sup>d</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Severo Ochoa, Leganés, Madrid, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 9 de febrero de 2010

Aceptado el 3 de septiembre de 2010

On-line el 20 de febrero de 2011

#### Palabras clave:

Inmunocromatografía  
PCR  
*Giardia duodenalis*  
*Cryptosporidium* spp.

### R E S U M E N

**Introducción:** En este trabajo se evalúan y comparan dos métodos inmunocromatográficos para la detección simultánea de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. en muestras de heces.

**Métodos:** Se han analizado 254 muestras de heces con dos métodos inmunocromatográficos, Crypto-Giardia (CerTest Biotec) y Stick Crypto-Giardia (Operon).

**Resultados:** En el diagnóstico de *G. duodenalis*, la sensibilidad y especificidad fueron del 97 y el 100%, respectivamente, para CerTest; y del 97 y el 95% para Operon. En el diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., la sensibilidad obtenida con el método de CerTest fue del 100%, frente a la sensibilidad del 92% obtenida con Operon. No hubo falsos positivos con ninguna de las dos técnicas.

**Conclusiones:** Ambos métodos presentan buenas sensibilidad y especificidad, por lo que son de utilidad para el diagnóstico rápido de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. Las ventajas de los métodos inmunocromatográficos son su rapidez y que no necesitan de personas expertas en microscopía ni de equipos especiales.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Assessment of two commercially available immunochromatographic assays for a rapid diagnosis of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal specimens

### A B S T R A C T

**Introduction:** To assess and compare the performance of two immunochromatographic tests for the simultaneous detection of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in faeces.

**Materials and methods:** In this study 254 faeces samples were tested using the two immunochromatography strips Crypto-Giardia (CerTest Biotec) and Stick Crypto-Giardia (Operon).

**Results:** In the diagnosis of *G. duodenalis*, the sensitivity and specificity of the kits were 97% and 100%, respectively for the CerTest; and 97% and 95% for Operon. In the diagnosis of *Cryptosporidium* spp. Certest strip rendering a sensitivity of 100%, compared to with a sensitivity of 92% using Operon. There were no false positives using either technique.

**Conclusions:** Both methods yielded good sensitivity and specificity values and are thus useful tools for a rapid diagnosis of *G. duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. The benefits of immunochromatography methods are that there is no requirement for expert microscopists or special equipment.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

#### Keywords:

Immunochromatography  
PCR  
*Giardia duodenalis*  
*Cryptosporidium* spp.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mjguti@isciii.es (M.J. Gutiérrez-Cisneros).

## Introducción

La infección por el protozoo flagelado *Giardia duodenalis* es muy común en todo el mundo. Tradicionalmente, el diagnóstico parasitológico de *G. duodenalis* se realiza por el examen microscópico de las heces. La sensibilidad de la técnica depende en gran medida del número de muestras examinadas, del uso de técnicas de concentración y de la destreza y experiencia del microscopista, por lo cual el diagnóstico de laboratorio de la infección por *G. duodenalis* suele ser laborioso y costoso.

*Cryptosporidium* spp. es un protozoo coccidio considerado de importancia emergente como causa de infecciones gastrointestinales, que afecta principalmente a niños y personas inmunodeficientes. Con frecuencia suele originar brotes, principalmente en guarderías, aunque en ocasiones se han descrito brotes de carácter masivo por contaminación hídrica<sup>1</sup>. El método tradicional de diagnóstico es la microscopia tras tinción por Ziehl-Neelsen por lo que, al igual que en el diagnóstico de *G. duodenalis*, el tiempo de realización de la técnica es largo y necesita de expertos microscopistas.

En los últimos años se han desarrollado técnicas de detección rápida de antígenos parasitarios, con el objetivo de ofrecer a los laboratorios clínicos métodos diagnósticos alternativos más sencillos.

En este trabajo, se comparan dos métodos comerciales inmunocromatográficos con el examen microscópico para la detección de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. en muestras de heces, y se utiliza una técnica basada en la PCR como método de confirmación.

## Material y métodos

El estudio se realizó en tres hospitales de Madrid a lo largo de 2 meses. Se analizaron 254 muestras de heces con las tiras inmunocromatográficas comerciales, Crypto-Giardia (CerTest Biotech, Zaragoza, España) y Stick Crypto-Giardia (Operon, Zaragoza, España), siguiendo estrictamente las recomendaciones del fabricante. Se incluyeron en el estudio heces diarreicas y, además, heces de pacientes con VIH positivo y de niños menores de 5 años. También se incluyeron como control muestras de heces en las que se habían observado quistes de *G. duodenalis* y ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

El examen microscópico de las muestras de heces se realizó tras el método de concentración de Ritchie y posterior observación con tinción no permanente de lugol. Para la visualización de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se realizó una tinción de Ziehl-Neelsen modificada.

En los casos de discordancia entre alguna de las técnicas y en los casos positivos, se realizó una técnica molecular de PCR como método confirmatorio, que se consideró como el método de referencia para el diagnóstico de las parasitosis.

Las heces se enviaron congeladas al laboratorio de Parasitología del Centro Nacional de Microbiología para realizar el diagnóstico molecular de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. Las heces se conservaron a -20 °C hasta la extracción del ADN, para lo cual se

**Tabla 2**

Evaluación de las técnicas inmunocromatográficas.

| Patógeno               | Técnica | S (%) | E (%) | VPP (%) | VPN (%) |
|------------------------|---------|-------|-------|---------|---------|
| <i>Giardia</i>         | CerTest | 97    | 100   | 100     | 99      |
|                        | Operon  | 97    | 95    | 86      | 99      |
| <i>Cryptosporidium</i> | CerTest | 100   | 100   | 100     | 100     |
|                        | Operon  | 92    | 100   | 100     | 99      |

utilizó el método comercial DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante, excepto una modificación ya que se elevó la temperatura de lisis a 95 °C para romper la pared del quiste de los parásitos a estudio.

Para el diagnóstico de *G. duodenalis* se realizó una PCR en tiempo real que empleó como diana el gen *SSUrDNA* del parásito. Los cebadores y las sondas utilizados fueron los descritos previamente por Verweij<sup>2</sup>. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl, utilizando como *buffer* de PCR TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Reino Unido), 0,5 µmol de cada iniciador, 0,2 µmol de sonda (TaqMan MGB, Applied Biosystems) y 3 µl del ADN obtenido, empleando el equipo ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) y las siguientes condiciones 2 min a 50 °C, 15 min a 95 °C, seguido de 45 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C.

El diagnóstico molecular de *Cryptosporidium* spp. se llevó a cabo mediante una *nested*-PCR que amplificó un fragmento de 516 pb del gen *COWP* descrita por Pedraza-Díaz et al.<sup>3</sup>.

## Resultados

De las 254 muestras analizadas, 166 fueron negativas y 88 fueron positivas mediante el examen microscópico. Todos los casos positivos fueron confirmados mediante la técnica de PCR. De las 88 heces positivas, 63 lo fueron para *G. duodenalis* y 25 para *Cryptosporidium*. En cuanto al diagnóstico mediante las tiras antigénicas (tabla 1), el método de CerTest presentó dos falsos negativos para *G. duodenalis* (61/63) y ningún falso positivo, mientras que la técnica de Operon ofreció dos falsos negativos para *G. duodenalis* (61/63) y 10 falsos positivos (181/191), ya que la PCR en tiempo real fue, además de la microscopia, negativa en esas 10 muestras. La sensibilidad y especificidad se muestran en la tabla 2.

En el diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., las 25 muestras en las que se habían observado ooquistes en la tinción de Ziehl-Neelsen fueron positivas con el método de CerTest (sensibilidad del 100%). Mientras que con el método de Operon, 23 fueron las muestras positivas (sensibilidad del 92%). No hubo falsos positivos con ninguna de las dos técnicas (tabla 2).

## Discusión

Los dos ensayos inmunocromatográficos para la detección de antígenos de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. evaluados en este trabajo son fáciles de realizar, rápidos y no requieren personal con experiencia ni equipos especiales, al contrario que el examen microscópico que es una técnica que consume mucho tiempo y necesita de personal experto en microscopia.

**Tabla 1**

Comparación de los resultados obtenidos entre dos técnicas inmunocromatográficas y microscopia en la detección de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. La PCR en tiempo real se usó como técnica de confirmación.

| Patógeno               | Microscopia | n   | Crypto-Giardia CerTest |          | Crypto-Giardia Operon |          | PCR      |          |
|------------------------|-------------|-----|------------------------|----------|-----------------------|----------|----------|----------|
|                        |             |     | Negativa               | Positiva | Negativa              | Positiva | Negativa | Positiva |
| <i>Giardia</i>         | Negativa    | 181 | 181                    | 0        | 181                   | 0        | NR       | NR       |
|                        | Positiva    | 63  | 10                     | 0        | 0                     | 10       | 10       | 0        |
| <i>Cryptosporidium</i> | Negativa    | 229 | 229                    | 0        | 229                   | 0        | NR       | NR       |
|                        | Positiva    | 25  | 0                      | 25       | 2                     | 23       | 0        | 25       |

Los resultados de sensibilidad y especificidad de los dos métodos comerciales analizados son similares a los obtenidos en trabajos con otros métodos comerciales<sup>4</sup>. Sin embargo, en otros estudios obtienen unos valores de sensibilidad muy bajos<sup>5</sup>, lo que indica que hay grandes diferencias entre los distintos métodos inmunocromatográficos comercializados<sup>6</sup> por lo que es interesante seleccionar un método cuya sensibilidad y especificidad hayan sido contrastadas.

El método inmunocromatográfico de CerTest para la detección de *Giardia* spp. mostró una alta especificidad, por lo que un resultado positivo por este método no necesita ser confirmado. No así con el de Operon, en el que se observaron 10 falsos positivos, no se confirmaron ni por microscopia ni por PCR en tiempo real, en el diagnóstico de *G. duodenalis*. En cuanto a los 4 falsos negativos (2 con CerTest y 2 con Operon), 3 se dieron en muestras de heces que tenían abundantes quistes del parásito, sólo en un falso negativo con CerTest la muestra tenía pocos quistes.

Respecto a la detección de *Cryptosporidium* spp., los dos métodos presentaron una alta especificidad, la sensibilidad de la técnica de CerTest fue del 100%, mientras que la de Operon disminuyó al 92% por 2 falsos negativos, estas muestras presentaban una baja carga parasitaria por microscopia.

En cuanto a los valores predictivos positivos y negativos obtenidos en este estudio, deben ser valorados con reservas dado que están en relación con la prevalencia del patógeno buscado. Si la prevalencia de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. fuese menor, el VPP podría decaer significativamente.

Estos métodos pueden ser muy útiles en el caso de brotes producidos por alguno de estos dos parásitos, ya que es una forma muy rápida y sencilla de analizar un elevado número de muestras.

En conclusión, los métodos de Certest y Operon evaluados en este trabajo presentan buenas sensibilidad y especificidad, por lo que son de utilidad para el diagnóstico rápido de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp., aunque el método de Certest demuestra una mayor especificidad en la detección de *Giardia* y una mayor sensibilidad para la detección de *Cryptosporidium*. No obstante, las técnicas de referencia como la microscopia y la PCR muestran una mayor fiabilidad diagnóstica, por lo que deben utilizarse en casos dudosos como técnicas confirmatorias.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

### Bibliografía

1. Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, et al. A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med*. 1994;331:161–7.
2. Verweij JJ, Schinkel J, Laeijendecker D, Van Rooyen MA, Van Lieshout L, Polderman AM. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Mol Cell Probes*. 2003;17:223–5.
3. Pedraza-Díaz S, Amar C, Nichols GL, McLauchlin J. Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:49–56.
4. Regnath T, Klemm T, Ignatius R. Rapid and accurate detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* spp. antigens in human fecal specimens by new commercially available qualitative immunochromatographic assays. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;25:807–9.
5. Oster N, Gehrig-Feistel H, Jung H, Kammer J, McLean JE, Lanzer M. Evaluation of the immunochromatographic CORIS *Giardia*-Strip test for rapid diagnosis of *Giardia lamblia*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;25:112–5.
6. Weitzel T, Dittrich S, Mohl I, Adusu E, Jelinek T. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:656–9.