

ARTÍCULO ORIGINAL

Evaluación de pruebas inmunológicas en el diagnóstico de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp., Honduras

Evaluation of immunologic tests in the diagnosis of Giardia duodenalis and Cryptosporidium spp., Honduras

Rina G. Kaminsky^{1,2}  <https://orcid.org/0000-0001-5363-1250>, Jorge A. García^{2,3}  <https://orcid.org/0000-0002-2217-9721>

¹Instituto de Enfermedades Infecciosas y Parasitología Antonio Vidal; ²Asociación Hondureña de Parasitología Tegucigalpa, Honduras.

³Hospital Escuela, Departamento de Laboratorio Clínico, Servicio de Parasitología; Tegucigalpa Honduras.

RESUMEN. Antecedentes: No conocemos datos sobre evaluación de pruebas inmunológicas para mejorar el diagnóstico de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp., agentes etiológicos de diarrea de importancia mundial, en Honduras. **Objetivos:** Comparar dos pruebas inmunológicas para el diagnóstico de *Giardia* y *Cryptosporidium* spp. con microscopía de rutina y determinar su aplicabilidad local. **Metodología:** Estudio descriptivo transversal. En 2013, 134 muestras de heces recibidas en el Servicio de Parasitología del Hospital Escuela (HE) y 67 muestras del Centro de Salud Alonso Suazo (CSAS) se analizaron con una Prueba Rápida Inmunocromatográfica (PDR). En 2019-2020, 60 muestras de heces del HE se analizaron con una prueba inmunoenzimática ELISA. El protocolo de rutina incluyó examen directo en solución salina y solución de Lugol, coloración tricrómica y coloración ácido resistente modificada (ARM) (HE) y examen directo en solución salina y solución de Lugol (CSAS). **Resultados:** Cada prueba inmunológica mostró mayor positividad que la microscopía: en 134 muestras del HE para *Giardia* (6.7% vs 4.5%) y *Cryptosporidium* (3.7% vs 0.7%), similar en 67 muestras del CSAS (14.9% vs 7.5% para *Giardia*; 0.7% para *Cryptosporidium* con la prueba inmunológica) De 60 muestras analizadas por ELISA en HE, 31.7% fue positiva por *Giardia* vs 18.3% en examen directo y 23.3% en coloración tricrómica; 6.7% positiva por *Cryptosporidium* spp. vs 3.3% por coloración ARM. **Discusión:** Pruebas inmunológicas aumentaron significativamente el diagnóstico de ambas parasitosis; sin embargo, publicaciones sobre pruebas similares ofrecieron resultados no concluyentes. Por costo elevado podrían reservarse para pacientes pediátricos, pacientes inmunocomprometidos en hospitales, complementando microscopía. Los laboratorios de salud deben fortalecer capacidad diagnóstica.

Palabras clave: *Cryptosporidium*, Diagnóstico, *Giardia*, Pruebas inmunológicas, Honduras.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la diarrea es la segunda causa de mortalidad en niños menores de 5 años.¹ En el año 2021 se reportaron 142,315 casos de diarrea sin sangre en Honduras, 55,667 (39.1%) en menores de 5 años, con una tasa de 6,530 casos por 100,000 habitantes;² se desconocen los factores determinantes asociados a diarrea en Honduras, *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp son causas más importantes de diarrea transmitida por agua y alimentos, estimándose más de 200 millones de episodios de giardiasis a nivel mundial.³ Aún en ausencia de síntomas entéricos, la infección persistente de giardiasis estuvo asociada con talla y peso reducidos a los dos años.⁴ La diarrea profusa por *Cryptosporidium* en menores de 24 meses causa desnutrición importante, con 8.5 veces más riesgo de muerte 2-3 meses después o retraso en el desarrollo físico y cognitivo más adelante; el Estudio Entérico Global Multicéntrico (GEMS siglas en inglés) identificó *Cryptosporidium* como la segunda causa más común de diarrea moderada o severa en menores de 2 años en siete países surasiáticos y África subsahariana y como la segunda prioridad en parásitos transmitidos por alimentos en algunos países europeos.^{5,6} La infección por *Cryptosporidium* en individuos con inmunidad comprometida por diferentes razones (malignidad, malnutrición, VIH/SIDA) es de importancia crítica por falta de opciones terapéuticas que erradiquen este parásito de la mucosa intestinal o respiratoria. Estas parasitosis son de importancia en salud pública y fueron definidas por la Organización Mundial de la Salud como Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETD), tomando en cuenta su alta prevalencia, el efecto negativo en el crecimiento, desarrollo y funciones cognitivas disminuidas a posteriori en niños infectados a temprana edad, que afecta la habilidad en alcanzar todo su potencial de desarrollo físico y socioeconómico.^{7,8}

Recibido: 06-11-2021 Aceptado: 10-06-2022 Primera vez publicado en línea: 22-6-2022

Dirigir correspondencia a: Dra. Rina Girard Kaminsky

Correo electrónico: camilaestela12@yahoo.com

RELACIONES Y ACTIVIDADES FINANCIERAS Y NO FINANCIERAS: Se obtuvo donación de dos estuches de pruebas inmunológicas diferentes: prueba rápida inmunocromatográfica ImmunoCard STAT (Fuerza de Tarea Conjunta Bravo, 2013) y prueba inmunoenzimática ELISA (IVD Research Inc., Quality Diagnostic Products, Carlsbad, CA, Estados Unidos; 2019)

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS: Ninguno.

Forma de citar: Kaminsky RG, García JA. Evaluación de pruebas inmunológicas en el diagnóstico de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp., Honduras. Rev Méd Hondur. 2022; 90 (1): 36-43. DOI: <https://doi.org/10.5377/rmh.v90i1.14394>

© 2022 Autor(es). Artículo de acceso abierto bajo la licencia <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es> 

Existen muchas técnicas de laboratorio para el diagnóstico confiable de estos parásitos en muestras de heces, tanto microscópicas como técnicas inmunológicas que utilizan antígenos específicos en pruebas rápidas inmunocromatográficas (PDR), o inmunoenzimáticas (ELISA por sus siglas en inglés), o detección de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) más sensible que la microscopía, o incluso métodos moleculares para la diferenciación entre especies de *Giardia* (5 especies diferentes y varios grupos) y entre especies de *Cryptosporidium* (23 especies diferentes y 61 genotipos) reservados, por su alto costo en infraestructura y personal especialmente adiestrado, a laboratorios de investigación y de poca aplicación en laboratorios de rutina en países de escasos recursos.^{8,9} Actualmente diferentes métodos inmunoenzimáticos y pruebas rápidas inmunocromatográficas comerciales que existen en el mercado de aplicación en laboratorios de rutina detectan antígenos parasitarios, son simples de ejecutar y ofrecen rapidez en el diagnóstico sin necesidad de equipo especial o incluso fluido eléctrico. Sin embargo, al ser elaborados por diferentes casas comerciales no existe reproducibilidad entre unos y otros por lo que deben ser previamente evaluados e interpretados.

No conocemos datos sobre evaluación de pruebas inmunológicas para mejorar el diagnóstico de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. en Honduras. Este estudio se realizó con los objetivos de probar dos métodos inmunológicos para diagnóstico de *Giardia* y *Cryptosporidium*, una prueba rápida inmunocromatográfica (PDR) y un método inmunoenzimático (ELISA por sus siglas en inglés), comparados con los resultados de la rutina microscópica en dos centros asistenciales en Tegucigalpa y determinar su aplicabilidad local.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio descriptivo transversal. Se revisaron y compararon los resultados de la rutina microscópica (método directo, coloración tricrómica y coloración Ácido Resistente Modificada, ARM) con dos pruebas inmunológicas diferentes para la detección de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. Para comparar métodos microscópicos con PDR, se realizó un muestreo por conveniencia en dos laboratorios: 134 muestras de heces del Servicio de Parasitología (SP) del Hospital Escuela (HE) y 67 muestras del laboratorio del Centro de Salud Alonso Suazo (CSAS) positivas por *Giardia* y/o *Cryptosporidium*, así como muestras negativas de consistencia diarreica o líquida (año 2013). Para la prueba de ELISA (año 2020) se tomó 60 muestras de heces del SP del HE de similares características. En el SP del HE se siguió el protocolo de examen de muestras establecido: examen macroscópico de la muestra, preparación de extendidos para coloración ARM y preparación directa en solución salina fisiológica y solución de Lugol. En el laboratorio del CSAS el examen de rutina consistió en registrar la consistencia de la muestra y un examen microscópico en solución salina y en solución de Lugol; dicho laboratorio no había implementado la coloración ARM. Una vez examinadas, las muestras de este laboratorio eran recogidas el mismo día antes de las 11:00 a.m. por personal asignado del SP del HE, sin

repetir el examen microscópico en el SP. El mismo día que se recibían dichas muestras en el SP del HE se realizaba la PDR, se anotaban en un registro específico los datos de edad y sexo del paciente, consistencia de la muestra y los resultados de la PDR y se entregaban al laboratorio del CSAS al día siguiente.

La donación en 2019 de estuches para la prueba inmunológica de ELISA permitió compararla con los resultados microscópicos de 60 muestras de heces del SP del HE. Se tomaron muestras de características descritas antes, guardando una alícuota de cada muestra a -20.0°C hasta el momento del análisis por ELISA. Para todas las muestras examinadas registraron los datos de la boleta de solicitud de: edad y sexo, y los siguientes grupos etarios: 0-5 años, 6 a 10 años y mayores de 10 años. Se registraron otros hallazgos microscópicos de interés: protozoos comensales, leucocitos, eritrocitos, cristales de Charcot-Leyden, presencia de moco, etc.

Se utilizaron dos pruebas inmunológicas. La prueba de diagnóstico rápido (PDR) ImmunoCard STAT! *Crypto/Giardia*, para la detección cualitativa de antígenos de *Giardia* y *Cryptosporidium* en muestras de heces humanas (Meridian Bioscience, Cincinnati, OH, Estados Unidos), donada por la Fuerza de Tarea Conjunta Bravo (FTCB) de los Estados Unidos de América. La prueba ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción ligado a Enzimas, por sus siglas en inglés) para la detección de antígenos de *Giardia duodenalis* y antígenos de *Cryptosporidium* spp. (IVD Research Inc., Quality Diagnostic Products, Carlsbad, CA, Estados Unidos). La prueba ELISA fue donada por el fabricante mencionado. En cada prueba inmunológica se siguieron las instrucciones provistas por el fabricante. Previa ejecución del método de ELISA se preparó un protocolo sobre papel dividido en 62 casillas, reservando las dos primeras casillas para anotar el control negativo y el control positivo respectivamente, y el resto para anotar el número de cada muestra de heces. La interpretación de resultados de la prueba ELISA se realizó por visión normal, marcando a lápiz en el protocolo las casillas de color amarillo que denota positividad, comparados con el control negativo y positivo según las instrucciones de la manufactura.

La comparación de los resultados de las pruebas inmunológicas y microscópicas se realizó mediante la estimación de Sensibilidad y Especificidad y su respectivo Intervalo de Confianza al 95% (IC95%), utilizando la calculadora estadística en línea OpenEpi para evaluación de Pruebas Diagnósticas (<https://www.openepi.com/DiagnosticTest/DiagnosticTest.htm>). Se evaluó el desempeño de los métodos inmunológicos utilizando como estándar de oro los métodos microscópicos y viceversa. La descripción de la población en estudio se realizó mediante la estimación de frecuencias y proporciones, para la variable edad se estimó la mediana porque los datos no presentaban una distribución normal. Para la descripción de los casos, se incluyó la totalidad de casos de giardiasis y criptosporidiasis diagnosticados por los diferentes métodos.

En este estudio la información de los participantes humanos se obtuvo de registros institucionales, por lo tanto, no se aplicó consentimiento informado ni se sometió un protocolo a dictamen ético. La información personal de los

participantes se manejó de manera confidencial por parte del equipo investigador. Para obtener acceso a los registros institucionales los autores realizaron la coordinación institucional correspondiente obteniendo la colaboración y aprobación para llevar a cabo el estudio en los diferentes periodos. Los resultados positivos (microscopía y PDR) fueron entregados al personal de laboratorio correspondiente quienes se responsabilizaron en hacer llegar dichos resultados al expediente clínico de los participantes.

RESULTADOS

El Cuadro 1 muestra resultados del 2013 y del 2019-2020 según aparece especificado en las columnas de las pruebas respectivas. De las 134 muestras del SP del HE, el 47.8% (64/134) era del sexo femenino, en 1.5% (2/134) no se registró ese dato. El 63.4% (85/134) tenía de 0 a 5 años, 11.9% (16/134) de 6 a 10 años y 23.9% (32/134) era mayores de 10 años; en 0.7% (1/134) no se consignó edad. El 32.8% (44/134) de las muestras era de consistencia diarreaica o líquida. El 6.7% (9/134) de las muestras fue positiva para *G. duodenalis* en PDR vs. 4.5% (6/134) en el examen microscópico directo; una de las muestras con quistes de *Giardia* en el examen directo fue negativa con PDR; la diferencia entre ambos porcentajes fue estadísticamente significativa ($p < 0.01$). Para el diagnóstico de *Cryptosporidium*, 3.0% (4/134) muestras fueron positivas por PDR, comparado con 0.7% (1/134) por microscopía; la diferencia entre ambos porcentajes fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

En el CSAS, 53.7% (36/67) muestras provenían del sexo femenino, con 52.2% (35/67) en la edad de 0-5 años, 35.8% (24/67) de 6 a 10 años y 12.0% (8/67) mayor de 10 años. El 89.5% (60/67) de las muestras era formada o blanda; el 14.9% (10/67) y 7.5% (5/67) fue positiva por *G. duodenalis* en PDR y por microscopía respectivamente, la diferencia entre ambos porcentajes fue estadísticamente significativa ($p < 0.01$); 0.7% (1/67) fue positiva por *Cryptosporidium* en PDR. No se consignan datos de ARM dado que esta técnica no se realizaba en el CSAS. Este establecimiento de salud informó 4.5% (3/67) muestras con leucocitos y 61.2% (41/67) con *Blastocystis* spp.

Las 60 muestras para la prueba de ELISA se recolectaron entre noviembre 2019 a marzo 2020 del SP del HE; 40.0% (24/60) del sexo femenino, 46.7% (28/60) tenía entre 0 a 5 años, 43.4% (38/60) de las heces era entre diarreaica y líquida. *Giardia duodenalis* fue diagnosticada en 31.7% (19/60) de las muestras con el método de ELISA, comparado con 23.3% (14/60) en la coloración tricrómica y 18.3% (11/60) en el examen directo; la diferencia entre el porcentaje detectado con ELISA y microscopía (coloración tricrómica) fue estadísticamente significativa ($p < 0.01$ (Cuadro 1). El 6.7% (4/60) de las muestras fue positiva para *Cryptosporidium* por ELISA vs 3.3% (2/60) por la coloración

Cuadro 1. Características de participantes y muestras de heces comparando métodos microscópicos y pruebas inmunológicas, en el diagnóstico de *Giardia* y *Cryptosporidium* spp., Hospital Escuela y Centro de Salud Alonso Suazo, 2013, 2019-2020, Honduras.

Características	ELISA (año 2020)	Inmunocromatografía (año 2013)	
	HE (n=60) n (%)	HE (n=134) n (%)	CSAS (n=67) n (%)
Sexo			
Femenino	24 (40.0)	64 (47.8)	36 (53.7)
Masculino	36 (60.0)	68 (50.7)	29 (43.3)
NC	0 (0.0)	2 (1.5)	2 (3.0)
Edad (Años)			
0 - 5	28 (46.7)	85 (63.4)	35 (52.2)
6 - 10	2 (3.3)	16 (11.9)	24 (35.8)
Mayor a 10	29 (48.3)	32 (23.9)	8 (12.0)
No Consignado	1 (1.7%)	1 (0.7%)	0 (0.0)
Mediana [Rango Intercuartílico]	9.0 [1.7 – 40.0]	2.2 [0.7 – 9.2]	5.0 [3.0 – 8.0]
Examen Físico de Heces			
Consistencia			
Formada	8 (13.3)	44 (32.8)	27 (40.3)
Blanda	14 (23.3)	43 (32.1)	33 (49.3)
Diarreaica	22 (36.7)	23 (17.2)	6 (8.9)
Líquida	16 (26.7)	21 (15.7)	1 (1.5)
No Consignado	0 (0.0)	3 (2.2)	0 (0.0)
Presencia de Moco	21 (35.0)	25 (18.7)	0 (0.0)
Detección de <i>Giardia duodenalis</i>			
Examen microscópico*	14 (23.3)	6 (4.5)	5 (7.5)
Prueba inmunológica	19 (31.7)	9 (6.7)	10 (14.9)
Valor de p (Test de Fisher)	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Detección de <i>Cryptosporidium</i>			
Examen microscópico**	2 (3.3)	1 (0.7)	-
Prueba inmunológica	4 (6.7)	4 (3.0)	1 (0.7)
Valor de p (Test de Fisher)	< 0.01	< 0.05	No realizado
Otros hallazgos			
<i>Cystoisospora belli</i> **	0 (0.0)	1 (0.7)	-
<i>Blastocystis</i> spp	17 (28.3)	30 (22.4)	41 (61.2)
Amebas comensales	9 (15.0)	22 (16.4)	20 (29.8)
Flagelados comensales (<i>Chilomastix</i> o <i>Trichomonas</i>)	2 (3.3)	2 (1.5)	12 (17.9)

*2019-2020: los métodos fueron examen directo y coloración tricrómica, 2013: examen directo en ambos sitios. **método usado fue coloración ARM, en CSAS este método no se ha implementado. HE=Hospital Escuela, CSAS=Centro de Salud Alonso Suazo, NC= no consignado

ARM, la diferencia entre ambos porcentajes fue estadísticamente significativa ($p < 0.01$). Se revisaron cinco muestras positivas por *Giardia duodenalis* en ELISA y negativas con la coloración tricrómica, habiendo encontrado un quiste bien definido en una de las láminas antes negativa. Igualmente, se revisó a posteriori las dos coloraciones ARM negativas y ELISA positivas, en

Cuadro 2. Características de los casos de giardiasis y criptosporidiasis, diagnosticados por métodos microscópicos e inmunológicos, Hospital Escuela y Centro de Salud Alonso Suazo, 2013, 2019-2020, Honduras.

Características	<i>Giardia</i> n=36	<i>Cryptosporidium</i> n=9
	n (%)	n (%)
Sexo		
Femenino	10 (27.8)	4 (44.4)
Masculino	26 (72.2)	5 (55.6)
Edad (años)		
0 - 5	20 (55.6)	7 (77.8)
6 - 10	6 (16.6)	0 (0.0)
Mayor a 10	10 (27.8)	2 (22.2)
Mediana	4.5	2.0
[Rango Intercuartílico]	[2.0 – 11.7]	[0.9 – 22.5]
Examen Físico de Heces		
Consistencia		
Formada	8 (22.2)	3 (33.3)
Blanda	13 (36.2)	3 (33.3)
Diarreica	7 (19.4)	1 (11.1)
Líquida	8 (22.2)	2 (22.2)
Presencia de Moco	5 (13.9)	4 (44.4)
Método de diagnóstico		
Método directo	22 (61.1)	NA
Coloración tricrómica	14 (38.9)	NA
Coloración ARM	NA	3 (33.3)
ELISA	19 (52.8)	4 (44.4)
PDR	19 (52.8)	5 (55.5)
Otros hallazgos en heces		
Coinfección <i>Giardia</i> y <i>Cryptosporidium</i>	1 (2.8)	1 (11.1)
<i>Blastocystis</i> spp	15 (41.7)	2 (22.2)
Amebas comensales	8 (22.2)	1 (11.1)
Flagelados*	4 (11.1)	0 (0.0)
Otros		
Leucocitos	4 (11.1)	4 (44.4)
Cristales de Charcot-Leyden	6 (16.6)	0 (0.0)
Grasa**	1 (2.8)	2 (22.2)

**Chilomastix* o *Trichomonas*, NA=No aplica. **Grasa: vista como glóbulos refringentes, ninguna metodología específica.

una se encontró ooquistes de *Cryptosporidium*. No hubo falsos negativos en esta prueba. Otros hallazgos fueron: 25% (15/60) con leucocitos, 6.7% (4/60) eritrocitos, 18.3% (11/60) cristales de Charcot-Leyden y 16.7% (10/60) con glóbulos de grasa.

En el SP del HE hubo una mayor proporción de solicitud de examen de heces en el sexo masculino; en CSAS la mayoría fue del sexo femenino. De los tres grupos etarios la frecuencia de solicitud fue mayor entre menores de 5 años; no se observó diferencia entre la consistencia de las heces, a excepción de las muestras del CSAS, en donde la mayoría era formada o blanda. La presencia de leucocitos varió entre 4.5% a 25%, y la de cristales de Charcot-Leyden, entre 6% y 18.3%. En muestras del SP del HE se informó 29.8% de coinfección con amebas comensales, 17.9% con flagelados comensales y entre 22.4% y 28.3% de *Blastocystis* spp. (**Cuadros 1 y 2**).

Analizando por separado las características de las 36 muestras positivas por *Giardia* (detectadas por cualquier método) (**Cuadro 2**) el 72.2% (26/36) correspondió al sexo masculino, 55.6% (20/36) entre 0-5 años (mediana 4.5 años), sin diferencias en la consistencia de las heces. El 41.7% (15/36) de las muestras tenía co-infección con *Blastocystis* spp, 22.2% (8/36) con amebas comensales y 11.1% (4/36) con flagelados comensales; en 16.6% (6/36) se reconoció cristales de Charcot-Leyden y leucocitos en 11.1% (4/36). En los 9 casos de *Cryptosporidium* spp., la frecuencia entre ambos sexos fue similar, 77.8% (7/9) en las edades entre 0-5 años, 66.6% (6/9) en heces formadas o blandas, 44.4% (4/9) presentaba leucocitos, 11.1% (1/9) amebas comensales y 22.2% (2/9) *Blastocystis* spp. No se hicieron comparaciones estadísticas entre criptosporidiasis y giardiasis; sin embargo, en giardiasis el 72% se presentó en el sexo masculino, había más moco y prevaleció la presencia de cristales de Charcot Leyden.

En las muestras del HE la PDR fue más sensible (83.3%, IC95% 43.7-96.9) y específica (96.9%, IC95% 92.3-98.8) que el método directo para detectar *Giardia* (**Cuadro 3**). A su vez, el método directo mostró 55.6% (IC95%: 26.7-81.1) de sensibilidad y 99.2% (IC95%: 95.6-99.9) de especificidad frente a la PDR. En el CSAS, la sensibilidad de la PDR fue de 100%

Cuadro 3. Sensibilidad y especificidad de técnicas microscópicas y métodos inmunológicos en el diagnóstico de *Giardia duodenalis*, 2013, 2019-2020, Honduras.

Método	Positivo		Estándar de oro	Sensibilidad	IC95%	Especificidad	IC95%
	n	(%)					
ELISA, HE, 2020							
	n=60						
Examen Directo	11	(18.3)	ELISA	57.9	(36.3-76.9)	100.0	(91.4-100.0)
Coloración Tricrómica	14	(23.3)	ELISA	73.7	(51.2-88.2)	100.0	(91.4-100.0)
ELISA	19	(31.7)	Directo	100.0	(74.1-100.0)	83.7	(70.9-91.5)
ELISA	19	(31.7)	Tricrómica	100.0	(78.5-100.0)	89.1	(76.9-95.3)
PDR, HE, 2013							
	n=134						
Examen Directo	6	(4.5)	PDR	55.6	(26.7-81.1)	99.2	(95.6-99.9)
PDR	9	(6.7)	Directo	83.3	(43.7-96.9)	96.9	(92.3-98.8)
PDR, CSAS, 2013							
	n=67						
Examen Directo	5	(7.5)	PDR	50.0	(23.7-76.3)	100.0	(93.7-100.0)
PDR	10	(14.9)	Directo	100.0	(56.5-100.0)	91.9	(82.5-96.5)

NR=No Realizado, HE=Hospital Escuela, CSAS=Centro de Salud Alonso Suazo; ARM=Acido-Resistente Modificado; PDR=Prueba de Diagnóstico Rápido (método Inmunoquímica)

Cuadro 4. Sensibilidad y especificidad de técnicas microscópicas y métodos inmunológicos, en el diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. 2013, 2019-2020, Honduras.

Método	Positivo		Estándar de oro	Sensibilidad	IC95%	Especificidad	IC95%
	n	(%)					
ELISA, HE, 2019-2020		n=60					
Coloración ARM	2	(3.3)	ELISA	50.0	(15.0-85.0)	100.0	(93.6-100.0)
ELISA	4	(6.7)	ARM	100.0	(32.2-100.0)	96.5	(88.3-99.0)
PDR, HE, 2013		n=134					
Coloración ARM	1	(0.7)	PDR	25.0	(4.6-69.9)	100.0	(97.1-100.0)
PDR	4	(3.0)	ARM	100.0	(20.6-100.0)	97.7	(93.6-99.2)

(IC95%: 56.5-100.0) al reconocer el doble de casos que el examen directo y una especificidad de 91.9% (IC95%: 82.5-96.5); el examen directo tuvo una sensibilidad de 50.0% (IC95%: 23.7-76.3) y especificidad de 100% (IC95% 93.7-100.0) frente a la PDR. En otras palabras, se detectó mayor número de positivos con PDR y no hubo falsos negativos. Igualmente, la prueba de ELISA fue más sensible y específica para detectar *Giardia* que el método directo (100%, IC95%: 74.1-100.) y 83.7%, IC95%: 70.9-91.5), respectivamente. La coloración tricrómica fue más sensible que el método directo (73.7%, IC95%: 51.2-88.2) con especificidad de 100% (IC95%: 91.4-100.0). El examen directo fue menos sensible, pero mantuvo la especificidad comparada con ELISA y la coloración tricrómica (57.9%, IC95%: 36.3-76.9 y 100%, IC95%: 91.4-100.0), respectivamente.

La detección de *Cryptosporidium* (**Cuadro 4**) por PDR comparado con ARM (HE), tuvo una sensibilidad de 100% (IC95% 20.6-100.0) y especificidad de 97.7% (IC95% 93.6-99.2); la coloración ARM comparada con la PDR tuvo una sensibilidad de 25.0% (IC95% 4.6-69.9) y especificidad de 100% (IC95% 97.1-100.0). En CSAS no se había implementado la coloración ARM

al momento de este estudio, lo que no permitió hacer estas estimaciones. En relación con la detección de *Cryptosporidium*, la prueba de ELISA tuvo sensibilidad de 100% (IC95% 32.2-100.0) y especificidad de 96.5% (IC95% 88.3-99.0) comparado con ARM; pero la coloración ARM tuvo una sensibilidad de 50.0% (IC95% 15.0-85.0) y especificidad de 100% (IC95% 93.6-100.0) comparado con ELISA.

En la **Figura 1A** se muestra un ooquiste de *Cryptosporidium* spp., coloreado por ARM e identificado por un color rojo-púrpura brillante, redondo o ligeramente ovalado; la medición de varios ooquistes fue entre 4 y 6 μ m de tamaño. Los quistes de *Giardia* (**Figura 1B**), las formas encontradas con mayor frecuencia fueron reconocidos por morfología: ovoides, entre 10-12 μ m de tamaño, de pared delgada y con una separación conspicua del citoplasma en el extremo redondeado, identificando en su interior 3-4 núcleos y restos de flagelos. Los trofozoítos (**Figura 1C, D**), que pueden estar presentes en heces frescas diarreicas o líquidas, se observan con menos frecuencia y se caracterizan por un disco succionario en su parte anterior y la presencia de 4 pares de flagelos que pueden definirse en

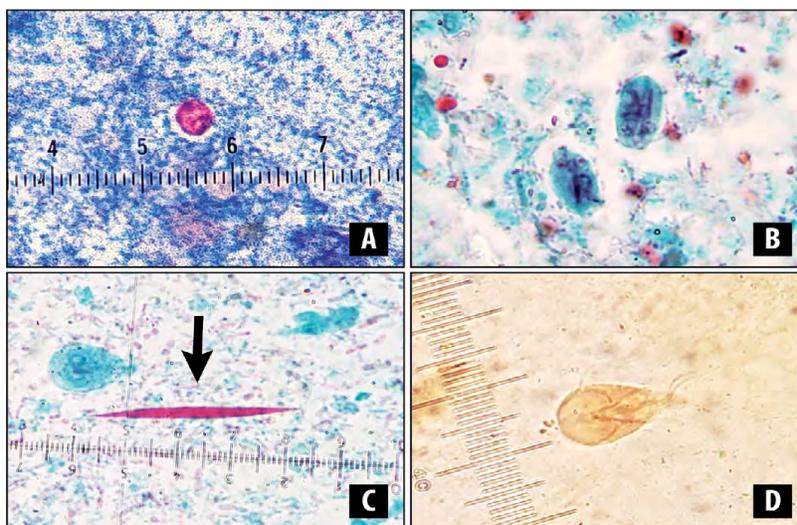


Figura 1. *Cryptosporidium* spp. y *Giardia duodenalis* A. *Cryptosporidium* spp., ooquiste teñido por carbol fucsina ácido-resistente modificado (ARM), B. *Giardia duodenalis*, dos quistes en coloración tricrómica (modificada de Wheatley), C. *Giardia duodenalis*, un trofozoíto en coloración tricrómica acompañado de un cristal de Charcot-Leyden (flecha), D. *Giardia duodenalis*, trofozoíto, coloreado con solución de Lugol. x1000 magnificación en todas. Originales García JA. Todas las fotografías corresponden al estudio y fueron tomadas en el SP del HE al momento del diagnóstico.

la coloración tricrómica o con solución de Lugol bajo objetivo de inmersión. No se contabilizó la presencia de trofozoitos y/o quistes en las muestras de heces; la morfología descrita es la morfología universal de las formas encontradas en muestras de heces, con pocas variaciones.

DISCUSIÓN

Según nuestro conocimiento, este es el primer informe de la aplicación de una coloración tricrómica y de dos métodos inmunológicos comparando con los resultados del examen coproparasitológico de pacientes que buscaron atención médica en el HE y en el CSAS. Las pruebas inmunológicas PDR y ELISA diagnosticaron mayor número de positivos para ambos parásitos comparado con los métodos microscópicos en los sitios estudiados; la PDR permitió identificar muestras que habían sido negativas por microscopía (3 *G. duodenalis* en el SP del HE y 5 en el CSAS y un *Cryptosporidium*); la prueba de ELISA fue más sensible que el método directo (100% vrs 57.9%) y la coloración tricrómica (100% vrs 73.7%). En el CSAS la PDR detectó *Cryptosporidium* en un niño de 2 años; ese centro no realiza la coloración ARM.

Estudios discutidos a continuación que evaluaron diferentes PDR concordaron que eran de fácil ejecución, requerían de poco tiempo y no necesitaban equipo especial. Sin embargo, mostraban resultados variables según la casa comercial productora, diferente metodología de producción, presencia de especies diferentes del parásito por regiones geográficas y costo adicional para el laboratorio.¹⁰ Tres PDR evaluadas en Malawi y Kenya, GIARDIA/CRYPTOSPORIDIUM QUIK-CHEK, RIDA-QUICK para *Cryptosporidium/Giardia* Combi y CRYPTO/GIARDIA DUO-Strip presentaron rangos de sensibilidad entre 48.2% en Malawi a 85.7% en Kenya para *G. duodenalis* y rangos entre 42.9% en Malawi a 76.9% en Kenya para *Cryptosporidium*. Por el contrario, la especificidad fue aceptable, de 88.7% a 100%. Se hace notar que los participantes eran niños severamente desnutridos con diarrea aguda; las ventajas de las PDR fueron su rapidez de ejecución y el hecho de no necesitar equipo especial. Una explicación para la baja sensibilidad es que podría tratarse de diferentes grupos de *Giardia* (C-F) o diferentes especies de *Cryptosporidium* o bien por una baja densidad parasitaria. Adicionalmente, al comparar la PDR ImmunoCard STAT! con inmunofluorescencia directa (IFD) en laboratorios de salud pública de Estados Unidos, se detectó un 45.6% de falsos positivos, asociado a heces de sujetos mayores de 25 años y tipo de preservante usado en el transporte de las heces.¹¹

Un problema importante en el diagnóstico de *Cryptosporidium* es la presencia de diferentes especies zoonóticas; *C. hominis* y *C. parvum* son las más frecuentes, pero otras como *C. meleagridis*, *C. bovis*, *C. canis* y *C. felis* también infectan al humano; de allí la necesidad de contar con pruebas capaces de identificar diferentes especies. Curiosamente, una misma prueba (CerTest Crypto) diseñada para identificar especies de *Cryptosporidium* dio resultados diferentes en cinco países africanos: la más alta

sensibilidad fue observada en Madagascar (72.2%) comparado con Gabón y Ghana con 50% y 52% respectivamente y el más bajo en Tanzania (35.2%); una sensibilidad general de 49.6%, especificidad de 92.5% y valor predictivo de 61.3%.¹² No hubo evidencia de que los resultados estuvieran influenciados por período de lluvia, período de evaluación, género o grupo etario y sí hubo concordancia de que la edad más parasitada por *Cryptosporidium* fue en los dos primeros años de vida.

Otro método inmunológico disponible es la prueba inmunoenzimática ELISA. Similar a las PDR, estuches de diferentes casas comerciales deberán ser evaluados antes de su implementación. Su ejecución demora más de una hora, pero pueden examinarse hasta 94 muestras de heces al mismo tiempo, con la ventaja de ofrecer considerable positividad frente al examen microscópico. Algunos estuches permiten la separación de pocitos individuales cuando urge el resultado en una rutina. Se experimentó una prueba prototipo en un área indígena rural de Guatemala, Tri-Combo Parasite Screen comparada con ELISAs individuales para *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica* en una población de 620 niños entre 18 meses y 6 años sin síntomas intestinales.¹³ Las pruebas individuales reconocieron 8.4% (52/620), 0.3% (2/620) y 0.5% (3/620) de *Giardia* spp., *E. histolytica* y *Cryptosporidium* spp. respectivamente, comparado con 5.7% (35/620), 0.5% (3/620) y 0% para los mismos parásitos reconocidos por métodos microscópicos; de los 57 positivos en las pruebas ELISA individuales solo 23 (40%) fueron positivos por microscopía. Los autores señalaron ventajas adicionales de esta prueba incluyendo su utilidad en área rural carente de electricidad o agua corriente en el laboratorio. Por otra parte, un estudio comparativo de cuatro métodos utilizando muestras seriadas humanas, de gatos y de perros en Brasil encontró que la prueba de ELISA fue positiva para *Giardia* en 69.8% (67/96) comparada con 89.6% (89/97) en un método de flotación por sulfato de zinc en sujetos que habían sido positivos por *G. duodenalis*.¹⁴ Estos investigadores concluyeron que la técnica de flotación de sulfato de zinc (Faust 1939) resultó mejor en sensibilidad y especificidad para detectar *G. duodenalis* de muestras seriadas de humanos, gatos y perros.¹⁴ En Beni-Suef, Egipto, la positividad de la prueba de ELISA en adultos jóvenes (31-40 años) y aquellos entre 51 a 60 años, todos inmuno normales, fue de 12.5% comparada con 9.5% en una coloración ARM. Al analizar la sensibilidad y especificidad de ELISA con la microscopía por el método ROC (Receiving Operating Characteristics, siglas en inglés), encontraron que ambas pruebas tenían una fuerte sensibilidad y especificidad, con un valor de $p < 0.0001$.¹⁵ Una revisión en la estrategia diagnóstica actual para *G. duodenalis* encontró que las pruebas inmunoenzimáticas eran igual o más sensitivas que el examen microscópico y concluía que la microscopía tradicional, en combinación con métodos de concentración, debía mantenerse en laboratorios de rutina por ser económicos y de alta sensibilidad, pudiendo dejar los métodos inmunológicos y moleculares como pruebas complementarias.¹⁶

La coloración tricrómica, menos exigente que la coloración clásica con hematoxilina férrica para el diagnóstico de

flagelados, ciliados y amebas intestinales no se había utilizado de rutina en el HE, si bien es un método más elaborado en costo, tiempo de ejecución y adiestramiento del personal que el método directo, las heces no están diluidas lo que facilitaría recuperar trofozoítos/quistes escasos y permite destacar la morfología particular de protozoos intestinales incluyendo *G. duodenalis*, asegurando mayor confiabilidad en el diagnóstico.¹⁷

La necesidad de un diagnóstico oportuno y confiable para estas infecciones parasitarias no está limitada a la importancia del manejo, en particular de niños vulnerables desnutridos y en especial *Cryptosporidium* spp. en pacientes inmunocomprometidos. Los datos obtenidos en el diagnóstico son contribuyentes al conocimiento de la epidemiología de estas parasitosis, necesarios en el diseño de medidas de prevención y control adecuadas y la obtención de estadísticas nacionales. Inexplicablemente, la implementación de una coloración específica para diagnóstico microscópico de *Cryptosporidium* no está generalizada en los laboratorios de salud en Honduras,¹⁸ a pesar de existir publicaciones al respecto en la Revista Médica Hondureña desde 1986.¹⁹ Por añadidura, criptosporidiasis es tema obligado en la enseñanza de parasitología a alumnos de V año e internos de la Facultad de Ciencias Médicas desde 1990.

Dentro de las limitantes del estudio se menciona: Se realizó entre población hospitalaria y de un centro de salud, sin comparar entre pacientes viviendo con VIH/SIDA, o población al azar asintomática, niños y adultos. El número de participantes estuvo limitado por la cantidad de pruebas inmunológicas recibidas como donación. Los métodos microscópicos utilizados, a excepción de la coloración tricrómica en el SP del HE, no incluyeron métodos de concentración ni el examen de varias muestras de un mismo paciente en días diferentes lo que posiblemente hubiera aumentado la positividad en los resultados por microscopía. No se contó con métodos diagnósticos de referencia, como extracción de ADN por PCR. Tampoco se cuantificó la cantidad de quistes/ooquistes presentes en preparaciones directas o coloreadas, lo cual tendría una relación directa con la positividad de la prueba inmunológica diseñada tal vez para una carga antigénica más alta. Al interpretar comparativamente los resultados de las pruebas inmunológicas frente métodos microscópicos, el tamaño de la muestra fue pequeño, lo que se reflejó en la baja cantidad de positivos, especialmente *Cryptosporidium*. Como consecuencia, los intervalos de confianza muestran inexactitud, que se refleja en la amplitud de las estimaciones.

Recobrar el parásito por cualquier método, microscópico en este caso (salvo métodos moleculares), confirma la etiología de cualquier infección parasitaria. En este estudio ambas

pruebas inmunológicas demostraron diferencias estadísticas significativas en la identificación de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* comparadas con microscopía; por ser más costosas para laboratorios de salud pública, podrían reservarse a pacientes pediátricos y pacientes inmunocomprometidos en hospitales, sin sustituir microscopía. Adicionalmente, los laboratorios de salud deben fortalecer la capacidad diagnóstica del personal a través de cursos de educación continua, facilitar la implementación de métodos de concentración (*Giardia*) y coloración ARM (*Cryptosporidium*), de aplicación universal y como base indispensable de experiencia.

Los cursos de educación continua que ofrece la Asociación Hondureña de Parasitología (AHPA), tienen como objetivo fortalecer, mejorar y actualizar la calidad técnica del personal de laboratorio y pueden ser una ayuda necesaria de tomar en cuenta.²⁰ Asimismo, el clínico debe ser alertado sobre estos parásitos en caso de que desconozca su presencia en la comunidad o su significado como causantes de enfermedad y la importancia de solicitar exámenes específicos cuando exista fuerte sospecha clínica. Esto permitiría mejorar la confiabilidad de los resultados, un manejo mejor dirigido del paciente y la construcción de datos epidemiológicos sobre la frecuencia de ambos parásitos, por lo menos en población que consulta al HE y en el CSAS.

CONTRIBUCIONES

Ambos autores contribuyeron de igual manera al desarrollo de la investigación, análisis de resultados, redacción del manuscrito y aprobaron la versión final del mismo.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Fuerza de Tarea Conjunta Bravo (FTCB) de los Estados Unidos de América por haber facilitado las pruebas de diagnóstico rápido (ImmunoCard STAT!) y a la casa comercial IVD Research Inc., Quality Diagnostic Products, Carlsbad, California, Estados Unidos de Norte América por facilitar la prueba de ELISA. Se reconoce al personal del laboratorio del Centro de Salud Alonso Suazo y a los Técnicos de Laboratorio Clínico Belinda Mendoza, Magdalena Moreira y Wendy López del Hospital Escuela, Tegucigalpa, por el diagnóstico microscópico desempeñado.

DETALLES DE LOS AUTORES

Rina Girard Kaminsky; Máster en Ciencias, Parasitología; Técnico de Laboratorio; camilaestela12@yahoo.com
Jorge A. García; Máster en Epidemiología, Licenciatura en Microbiología; garciaguilarjorge@gmail.com

REFERENCIAS

1. UNICEF. One is too many. Ending child deaths from pneumonia and diarrhea. [Internet] Nueva York: UNICEF; 2016. [citado febrero 2022]. Disponible en: <https://www.unicef.org/publications/files/UNICEF-Pneumonia-Diarrhoea-report-2016-web-version5.pdf>. 2019
2. Secretaría de salud (HN). Unidad de Vigilancia de la Salud. Boletín epidemiológico 2020-2021. Tegucigalpa: Secretaría de Salud; 2022.
3. Efstratiou A, Ongerth JE, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. Water Research [Internet]. 2017 [citado febrero 2022];114:14-22. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.036>
4. Rogawski ET, Bartelt L, Platts-Mills JA, Seidman JC, Samie A, Havt A, et al. Determinants and Impact of Giardia Infection in the First 2 Years of Life in the MAL-ED Birth Cohort. J Ped Infec Dis Soc. [Internet]. 2017 [citado febrero 2022];6(2):153-160. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jpids/piw082>
5. Kotloff K L. The burden and etiology of diarrheal illness in developing

- countries *Pediatr Clin N Am* [Internet]. 2017 [citado agosto 2019];64:799-814. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcl.2017.03.006>
6. Carter BL, Chalmers RM, Davis AP. Health sequelae of human cryptosporidiosis in industrialised countries: a systematic review. *Parasites Vectors* [Internet]. 2020 [citado agosto 2021];13(1):443. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04308-7>
 7. Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'neglected diseases initiative'. *Trends Parasitol* [Internet]. 2006 [citado agosto 2019];22(5):203-208. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.015>
 8. Adeyemo FE, Singh G, Reddy P, Stenström TA. Methods for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*: from microscopy to nucleic acid-based tools in clinical and environmental regimes. *Acta Tropica* [Internet]. 2018 [citado agosto 2019];184:15-28. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.01.011>
 9. Heyworth MF. Diagnosis testing for *Giardia* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2014 [citado agosto 2019];108(3):123-125. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/trstmh/tru005>
 10. Bitilinyu-Bangoh J, Voskuijl W, Thitiri J, Menting S, Verhaar N, Mwalekwa L, et al. Performance of three rapid diagnostic tests for the detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in children with severe acute malnutrition and diarrhoea. *Infecti Dis Poverty* [Internet]. 2019 [citado febrero 2022];8(1):96. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s40249-019-0609-6>
 11. Roellig DM, Yoder JS, Madison-Antenucci S, Robinson TJ, Van TT, Collier SA, et al. Community laboratory testing for *Cryptosporidium*: multicenter study retesting public health surveillance samples positive for *Cryptosporidium* by rapid cartridge assay with direct fluorescent antibody testing. *PLoS ONE* [Internet]. 2017 [citado agosto 2019];12(1): e0169915. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169915>
 12. Manouana GP, Lorenz E, Mbong Ngwese M, Nguema Moure PA, Maiga Ascofare O, Akenten CW, et al. Performance of a rapid diagnostic test for the detection of *Cryptosporidium* spp. in African children admitted to hospital with diarrhea. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020 [citado agosto 2019];14(7):e0008448. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008448>
 13. Den Hartog J, Rosenbaum L, Wood Z, Burt D, Petri Jr WA. Diagnosis of multiple enteric protozoan infections by enzyme linked immunosorbent assay in the guatemalan highlands. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2013 [citado agosto 2019];88:167-171. Disponible en: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0142>
 14. Fernandes de Mendonça Uchôa F, Pittella Sudré A, Destri Emmerick Campos S, Pereira Almosny NR. Assessment of the diagnostic performance of four methods for the detection of *Giardia duodenalis* in fecal samples from human, canine and feline carriers. *J Microbiol Meth* [Internet]. 2018 [citado febrero 2022];145:73-78. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.01.001>
 15. Abdel Gawad SS, Ismail MAM, Imam NFA, Eassa AHA, abu-Sarea EY. Detection of *Cryptosporidium* spp. in Diarrheic Immunocompetent Patients in Beni-Suef, Egypt: Insight into Epidemiology and Diagnosis. *Korean J Parasitol*. [Internet]. 2018 [citado febrero 2022];56(2):113-119. Disponible en: <https://doi.org/10.3347/kjp.2018.56.2.113>
 16. Hooshyar H, Rostamkhani P, Arbabi M, Delavari M. *Giardia lamblia* infection: review of current diagnostic strategies. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* [Internet]. 2019 [citado febrero 2022];12(1):3-12. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30949313/>
 17. Agrawal N, Sharma U, Sharma AK. Trichrome staining for detection of intestinal protozoa a better screening method. *J Commun Dis* [Internet]. 2006 [citado febrero 2022];38(4):351-354. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/17913212>
 18. García JA, López W, Alger J, Matute ML, Kaminsky RG. Diagnóstico parasitológico de laboratorios clínicos públicos y privados de Tegucigalpa, Honduras: ¿Capacidad de Respuesta? *Rev Med Hondur* [Internet]. 2014 [citado febrero 2022];82:148-154. Disponible en: <https://www.camjol.info/index.php/RMH/article/view/12863>
 19. Kaminsky RG. Revista Médica Hondureña: noventa años de aportes en Parasitología. *Rev Med Hondur* [Internet]. 2020 [citado febrero 2022];88(1):8-15. Disponible en: <https://doi.org/10.5377/rmh.v88i1.11601>
 20. Alger J, García J, Kaminsky RG. Actividades de educación continua: experiencia de la Asociación Hondureña de Parasitología, Tegucigalpa, 2010-2017. *Rev Med Hondur* [Internet]. 2018 [citado febrero 2022];86(Suppl):S78. Disponible en: <http://www.bvs.hn/RMH/pdf/2018/pdf/Vol86-S1-2018-17.pdf>

ABSTRACT. Background. We know no data about evaluation of immunologic tests for improved diagnosis of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp., worldwide important etiologic agents of diarrhea, in Honduras. **Objectives.** To evaluate two immunologic tests for the diagnosis of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. and determine their applicability compared to microscopy results. **Methodology.** Descriptive transverse study. One hundred and sixty-four stool samples from the Parasitology Service, Hospital Escuela (HE) and 67 samples from a health center were analyzed with an immunochromatographic rapid test (2013); 60 samples from SP were tested by an immunoenzymatic test ELISA (2019-2020). Microscopic routine protocol examination included direct smear in saline and Lugol solutions, trichrome stain and carbol fuchsin acid resistant modified stain (ARM). **Results.** Either immunologic test recognized more *Giardia* (6.7% vs 4.5%) and *Cryptosporidium* (3.7% vs 0.7%) than microscopy in 134 samples at HE with the rapid immunochromatographic assay, as well as in 67 samples at CSAS (14.9% vs. 7.5% for *Giardia* and 0.7% for *Cryptosporidium* with immunological test). Of 60 samples analyzed by ELISA test in HE, 31.7% was positive for *Giardia* compared to 18.3% in the direct smear and 23.3% with trichrome stain; *Cryptosporidium* spp. was 6.7% positive compared to 3.3% with ARM stain. **Discussion.** Immunologic tests significantly improved *Giardia* and *Cryptosporidium* microscopic diagnosis; however, other publications utilizing similar tests presented inconclusive results. High cost would limit their use for pediatric and immunocompromised patients in hospitals, complementing microscopy. Public health laboratories must strengthen diagnostic capacity. **Keywords:** *Cryptosporidium*, Diagnosis, *Giardia*, Honduras, Immunologic tests.