

Εκτίμηση δύο ανοσοενζυμικών και μιας ανοσοχρωματογραφικής ταχείας μεθόδου για την ανίχνευση ειδικών αντιγόνων της *Giardia lamblia* στα κόπρανα ασθενών με λαμβλίαση

ΣΚΟΠΟΣ Η εκτίμηση της ευαισθησίας και ειδικότητας δύο ανοσοενζυμικών μεθόδων (Alexon-Trend ProSpect *Giardia* Microplate Assay και Cypress Diagnostics Giardiasis Ag ELISA) και μιας ανοσοχρωματογραφικής (Becton Dickinson ColorPAC *Giardia/Cryptosporidium* Rapid Assay) σε σύγκριση με τη μικροσκοπική ανίχνευση των κύστεων και τροφοζωιτών της *Giardia* στα κόπρανα, με σκοπό την αξιολόγηση της χρησιμότητάς τους ως εναλλακτικών μεθόδων διάγνωσης της λαμβλίασης. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 2,5 ετών εξετάστηκαν στο Εργαστήριό μας 5.800 δείγματα με τη συνήθη μικροσκοπική εξέταση των κοπράνων για ωάρια και παράσιτα (άμεσο νωπό παρασκεύασμα και μετά από συγκέντρωση). Όλα τα θετικά με τη μικροσκοπική εξέταση κόπρανα για κύστες ή και τροφοζώιτες της *Giardia* φυλάγονταν στους -70 °C, φρέσκα, χωρίς μονιμοποίηση. Τα δείγματα αυτά εξετάστηκαν αναδρομικά για την παρουσία αντιγόνου *Giardia* με τις 3 μεθόδους και σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευαστικής εταιρείας. Εξετάστηκαν επίσης ταυτόχρονα και 52 δείγματα κοπράνων, τα οποία με τη μικροσκοπική εξέταση βρέθηκαν αρνητικά για κύστες ή τροφοζώιτες του πρωτοζώου. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Από τα 5.800 δείγματα κοπράνων που εξετάστηκαν, 61 (29 από Έλληνες και 32 από μετανάστες) βρέθηκαν θετικά για *Giardia* με τη μικροσκοπική εξέταση (1,05%). Με τη μέθοδο της Alexon-Trend (ProSpect *Giardia* Microplate Assay) και στα 61 θετικά δείγματα ανιχνεύτηκε το ειδικό για την *Giardia* αντιγόνο (GSA-65) (ευαισθησία 100%). Δύο δείγματα από τα 61 (με τις χαμηλότερες απορροφήσεις στη μέθοδο της Alexon-Trend) βρέθηκαν αρνητικά με την ανοσοχρωματογραφική (ευαισθησία 96,72%) και το ένα από τα αυτά και με τη μέθοδο της Cypress Diagnostics (ευαισθησία 98,36%). Με όλες τις μεθόδους και τα 52 αρνητικά δείγματα βρέθηκαν αρνητικά (ειδικότητα 100%). **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** (α) Η ανοσοενζυμική μέθοδος ProSpect *Giardia* Microplate Assay, η οποία είναι τόσο ευαίσθητη και ειδική όσο και η μικροσκοπική ανίχνευση του παρασίτου, και κατά δεύτερο λόγο η Giardiasis Ag ELISA, μπορούν να αποτελέσουν εναλλακτικές και συμπληρωματικές μεθόδους της μικροσκοπικής εξέτασης των κοπράνων, ιδιαίτερα σε χρόνια διαρροϊκά σύνδρομα ή σε κλινική υποψία της λαμβλίασης, όταν η πρώτη παρασιτολογική εξέταση είναι αρνητική. (β) Η ανοσοχρωματογραφική μέθοδος θα μπορούσε να εφαρμοστεί ως μια ταχεία αδρή δοκιμασία, χωρίς το αρνητικό αποτέλεσμα να αποκλείει τη λοίμωξη.

Η λοίμωξη από *Giardia lamblia*, η οποία συνήθως γίνεται με τη λήψη μολυσμένου νερού, μπορεί να είναι ασυμπτωματική ή να προκαλέσει οξεία διάρροια ή χρόνιο διαρροϊκό σύνδρομο με δυσαπορρόφηση και απώλεια βάρους.¹ Μέχρι πριν από μία περίπου δεκαετία, η

μοναδική μέθοδος διάγνωσης της λοίμωξης ήταν η μικροσκοπική εξέταση παρασκευασμάτων κοπράνων για την ανίχνευση των χαρακτηριστικών κύστεων και τροφοζωιτών του παρασίτου. Η ευαισθησία όμως της συνήθους παρασιτολογικής εξέτασης ενός δείγματος κοπρά-

Κ. Τζανέτου,
Ε. Δοθαψάκη,
Χ. Κάκαρη,
Α. Σιδέρη,
Α. Βθαχάκη,
Ε. Μιχαηλίδου,
Α. Τσουκνίδα,
Σ. Ποηιτάκη,
Α. Τσαντές,
Β. Παπαϊωάννου,
Γ. Μπτσάκου,
Ε. Μαθήμου-Λαδά

Μικροβιολογικό Εργαστήριο,
Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο
Αθηνών «Γ. Γεννηματάς», Αθήνα

Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assays and one immunochromatographic rapid assay for the detection of *Giardia lamblia*-specific antigens in fecal specimens of patients with giardiasis

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Ανοσοενζυμική
Ανοσοχρωματογραφική
Ειδικά αντιγόνα *Giardia*
Λαμβλίαση

Υποβλήθηκε 25.6.2002

Εγκρίθηκε 7.11.2002

νων για τη διάγνωση της λαμβλίας έχει βρεθεί σε αρκετές μελέτες να είναι χαμηλή.^{2,3} Η φτωχή αυτή ευαισθησία οφείλεται κυρίως στη διαλείπουσα ή στη μικρού αριθμού αποβολή των κύστεων και τροφοζωιτών του παρασίτου.⁴ Για το λόγο αυτόν, οι συγγραφείς βιβλίων Παρασιτολογίας συνιστούν την ανεξάρτητη συλλογή πολλών δειγμάτων κοπράνων (τουλάχιστον 6) για παρασιτολογική εξέταση.⁵

Στην προσπάθεια βελτίωσης των διαγνωστικών δοκιμασιών και αντιμετώπισης του προβλήματος της κυκλικής αποβολής του παρασίτου, αναπτύχθηκαν νέες μέθοδοι, οι οποίες ανιχνεύουν ειδικά για την *Giardia* αντιγόνα, ανεξάρτητα από την παρουσία κύστεων ή τροφοζωιτών του πρωτόζωου στα κόπρανα. Την τελευταία δεκαετία, ένας αριθμός ανοσοενzymικών μεθόδων (EIAs) για την ανίχνευση ειδικών για την *Giardia* αντιγόνων στα κόπρανα διατίθεται εμπορικά και, πρόσφατα, μια νέα ταχεία ανοσοχρωματογραφική μέθοδος (immunochromatographic assay) για την ταυτόχρονη ανίχνευση αντιγόνων *Giardia* και *Cryptosporidium*.

Στη μελέτη αυτή εκτιμήθηκε η ευαισθησία και ειδικότητα δύο ανοσοενzymικών μεθόδων (Alexon-Trend ProSpecT *Giardia* Microplate Assay και Cypress Diagnostics Giardiasis Ag ELISA) και μιας ανοσοχρωματογραφικής (Becton Dickinson ColorPAC *Giardia/Cryptosporidium* Rapid Assay) σε σύγκριση με τη μικροσκοπική ανίχνευση των κύστεων και τροφοζωιτών της *Giardia* στα κόπρανα, με σκοπό την αξιολόγηση της χρησιμότητάς τους ως εναλλακτικών μεθόδων διάγνωσης της λαμβλίας.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Συλλογή δειγμάτων

Κατά τη διάρκεια 2,5 ετών (από τον Ιανουάριο του 2000 έως το Μάιο του 2002) εξετάστηκαν στο Εργαστήριό μας 5.800 δείγματα κοπράνων για ωάρια και παράσιτα. Η εξέταση περιελάμβανε άμεσο παρασκεύασμα (με φυσιολογικό ορό και lugol) και εμπλουτισμό των κοπράνων με μια τροποποιημένη μέθοδο καθίζησης του Ritchie με φορμαλδεϋδη-αιθέρα (PARA-PAK MAKRO-CON stool concentration system, Meridian diagnostics Inc). Όλα τα δείγματα των κοπράνων, που με τη μικροσκοπική εξέταση ήταν θετικά για κύστεις ή τροφοζωίτες της *Giardia*, φυλάσσονταν στους -70 °C φρέσκα, χωρίς μονιμοποίηση, σε 10% formalin ή SAF (Sodium Acetate Acetic acid Formalin).

Μέθοδοι ανίχνευσης αντιγόνου *Giardia* στα κόπρανα

Τα θετικά κόπρανα για κύστεις ή τροφοζωίτες της *Giardia*, που είχαν φυλαχθεί στους -70 °C (61 δείγματα), εξετάστηκαν

αναδρομικά για την παρουσία αντιγόνου *Giardia* με 3 μεθόδους (2 ανοσοενzymικές και μία ανοσοχρωματογραφική) και σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευαστικής εταιρείας. Εξετάστηκαν επίσης ταυτόχρονα και 52 δείγματα κοπράνων, τα οποία με τη μικροσκοπική εξέταση (άμεσο παρασκεύασμα και μετά από εμπλουτισμό) βρέθηκαν αρνητικά για κύστεις ή και τροφοζωίτες της *Giardia*. Τα 52 αρνητικά δείγματα κοπράνων ελήφθησαν τυχαία από ασθενείς του Νοσοκομείου μας, που νοσηλεύονταν για διάφορες παθήσεις, αλλά και από εξωτερικούς ασθενείς, οι οποίοι βρέθηκαν αρνητικοί για το πρωτόζωο σε 3 τουλάχιστον παρασιτολογικές εξετάσεις κοπράνων διαδοχικών ημερών.

α. ProSpecT *Giardia* Microplate Assay (Alexon-Trend), για την ανίχνευση του ειδικού για την *Giardia* αντιγόνου 65 (GSA-65). Αυτό είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 65.000 Da, η οποία παράγεται σε αφθονία από το πρωτόζωο καθώς πολλαπλασιάζεται στο λεπτό έντερο. Η απέκκριση του GSA-65 δεν εξαρτάται από την απέκκριση των κύστεων ή τροφοζωιτών στα κόπρανα, αλλά ανιχνεύεται μόνον όταν υπάρχει λοίμωξη από *Giardia* ανεξάρτητα από την παρουσία του πρωτόζωου στα κόπρανα. Αραιωμένα δείγματα κοπράνων προστίθενται σε μικροπλάκες, στις οποίες είναι συνδεδεμένο ένα αντι-GSA-65 αντίσωμα. Οι πλάκες επωάζονται και κατόπιν ξεπλένονται, για να απομακρυνθεί το αδέσμευτο υλικό. Στη συνέχεια, προστίθεται ένα μονοκλωνικό αντι-GSA-65 αντίσωμα συνδεδεμένο με υπεροξειδάση (peroxidase labeled mouse monoclonal anti-GSA). Μετά την επώαση και το πλύσιμο προστίθεται το υπόστρωμα. Η ανάπτυξη χρώματος ανιχνεύεται σε σπεκτοφωτόμετρο στα 450 nm. Σε αρνητική αντίδραση δεν υπάρχει GSA-65 για να συνδεθεί με το ένζυμο (enzyme conjugate) και δεν αναπτύσσεται χρώμα.

β. Giardiasis Ag ELISA (Cypress Diagnostics). Αραιωμένα κόπρανα (1:15) προστίθενται σε μικροπλάκες επικαλυμμένες με ειδικό αντίσωμα. Μετά την επώαση (20 min σε θερμοκρασία δωματίου) και το πλύσιμο ακολουθεί η προσθήκη ενός αντι-*Giardia* αντισώματος συνδεδεμένου με βιοτίνη (anti-*Giardia* antibody/biotin conjugate). Το επόμενο στάδιο, αφού προηγηθεί το πλύσιμο, περιλαμβάνει την προσθήκη μιας στρεπταβιδίνης συνδεδεμένης με υπεροξειδάση (streptavidin/peroxidase conjugate). Μετά από επώαση 5 min και το επακόλουθο πλύσιμο, προστίθεται ένα διάλυμα υποστρώματος/χρωμογόνου (substrate/chromogen solution). Όπου υπάρχει σύμπλεγμα αντισώματος/ειδικό αντιγόνο *Giardia*/αντι-*Giardia* αντίσωμα-συνδεδεμένο με biotin/streptavidin-συνδεδεμένο με υπεροξειδάση σχηματίζεται μπλε χρώμα, το οποίο μετά τον τερματισμό της αντίδρασης γίνεται κίτρινο. Η ένταση του χρώματος μετρείται σε σπεκτοφωτόμετρο στα 450 nm. Η συγκέντρωση των ειδικών αντιγόνων της *Giardia* στο εξεταζόμενο δείγμα είναι ανάλογη με την ένταση του αναπτυσσόμενου χρώματος.

γ. ColorPAC *Giardia/Cryptosporidium* Rapid Assay (Becton Dickinson). Είναι μια ανοσοχρωματογραφική μέθοδος, η οποία συγχρόνως ανιχνεύει και διακρίνει αντιγόνα *Giardia* και *Cryptosporidium* σε δείγματα κοπράνων του ασθενούς. Σε 2

σταγόνες buffer (sample treatment buffer) προστίθενται περίπου 60 μL από αραιωμένα κόπρανα (τα μη μονιμοποιημένα 1:4 σε H_2O). Ακολουθεί η προσθήκη (2 σταγόνων) αντι-*Giardia* αντισώματος συνδεδεμένου με biotin (biotinylated anti-*Giardia* capture antibody reagent) και 2 σταγόνων εναιωρήματος κολλοειδούς χρωστικής συνδεδεμένης με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της *Giardia* και του *Cryptosporidium*. Το δείγμα αναμιγνύεται και ρίπεται στη συσκευή, η οποία περιέχει στη θέση της *Giardia* ένα δεσμευτικό αντιδραστήριο, παράγωγο της αβιδίνης (avidin derivative), στη θέση του *Cryptosporidium* ένα δεσμευτικό αντίσωμα (capture antibody) για το *Cryptosporidium* και στη θέση CONT ένα αντίσωμα που δεσμεύει την περίσσεια της κολλοειδούς χρωστικής. Εάν στο δείγμα υπάρχει αντιγόνο της *Giardia*, στη θέση GIAR σχηματίζεται μια μαύρη ταινία, που μπορεί να ποικίλλει σε ένταση, από ασθενής έως έντονη. Το αποτέλεσμα διαβάζεται μέσα σε 10 min. Η εμφάνιση μαύρης ταινίας στη θέση CONT δείχνει (α) την εγκυρότητα της δοκιμασίας, (β) ότι η κολλοειδής χρωστική είναι ακέραιη και (γ) ότι υπάρχει αρκετή τριχοειδική ροή (εικ. 1).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

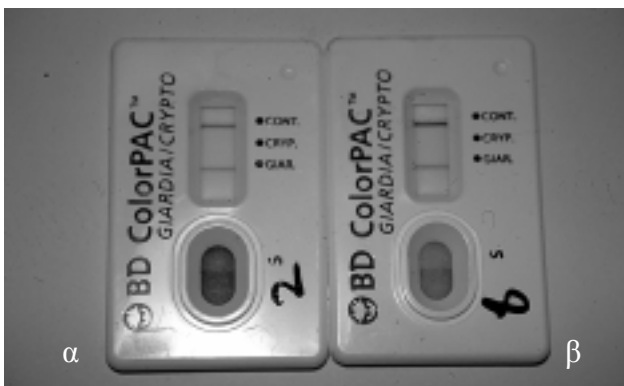
Από τα 5.800 δείγματα κοπράνων που εξετάστηκαν κατά τη διάρκεια των 2,5 ετών για κύστεις ή τροφοζώιτες πρωτοζώων και ωάρια ή προνύμφες ελμίνθων, βρέθηκαν 61 δείγματα ασθενών (1,05%) θετικά για *Giardia*. Σε κανένα από τα 61 θετικά δείγματα δεν ανιχνεύθηκαν πυοσφαίρια και ερυθρά. Από τους 61 ασθενείς, οι 29 (47,5%) ήταν Έλληνες και οι 32 (52,5%) αλλοδαποί (κυρίως από Αλβανία, Πολωνία, Ρουμανία και χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης). Από τους 29 Έλληνες, οι 12 (41,38%) προσήλθαν με οξύ διαρροϊκό σύνδρομο, ένας με χρόνια διάρροια (3,45%) και οι υπόλοιποι 16 (55,17%) ήταν ασυμπτωματικοί. Από τους 32 αλλοδα-

πούς, οι 30 (93,75%) ήταν ασυμπτωματικοί και οι 2 (6,25%) είχαν χρόνια διάρροια (πίν. 1). Όλοι οι ασυμπτωματικοί φορείς βρέθηκαν τυχαία θετικοί με την εξέταση του πρώτου δείγματος κοπράνων, σε 2 από τους 12 ασθενείς με το οξύ διαρροϊκό σύνδρομο το πρωτόζωο ανιχνεύτηκε στο δεύτερο δείγμα κοπράνων, ενώ σε 2 από τους 3 ασθενείς με τη χρόνια διάρροια χρειάστηκαν για την ανεύρεση του παρασίτου 2 και 3 δείγματα κοπράνων, αντίστοιχα.

Με τη μέθοδο της Alexon-Trend ProSpecT *Giardia* Microplate Assay, σε όλα τα θετικά για *Giardia* με τη μικροσκοπική εξέταση των κοπράνων δείγματα ανιχνεύτηκε το GSA-65, οι δε απορροφήσεις με το σπεκτοφωτόμετρο στα 450 nm κυμαίνονταν από 0,959 έως >2,500. Τα 52 αρνητικά για *Giardia* με τη μικροσκοπική εξέταση των κοπράνων, που περιελήφθησαν στη μελέτη, βρέθηκαν όλα αρνητικά για GSA-65 δείγματα, με απορροφήσεις που κυμαίνονταν από 0,001 έως 0,005 (πίν. 2).

Δύο από τα 61 δείγματα με τις χαμηλότερες απορροφήσεις (0,959 και 1,033) στη μέθοδο της Alexon-Trend (ProSpecT *Giardia* Microplate Assay) βρέθηκαν αρνητικά με την ανοσοχρωματογραφική μέθοδο (ColorPAC *Giardia*/*Cryptosporidium*) και το ένα από αυτά (0,959) βρέθηκε αρνητικό και με την ανοσοενζυμική μέθοδο της Cypress Diagnostics (*Giardiasis* Ag ELISA). Με όλες τις μεθόδους και τα 52 αρνητικά δείγματα βρέθηκαν αρνητικά (πίν. 2).

Η ευαισθησία, η ειδικότητα, η θετική προγνωστική αξία (positive predictive value) και η αρνητική προγνωστική αξία (negative predictive value) και των 3 μεθόδων, σε σύγκριση με τη μικροσκοπική εξέταση των κοπράνων, υπολογίστηκαν από τους τύπους:



Εικόνα 1. ColorPAC συσκευές. (α, β) Θετικά αποτελέσματα για αντιγόνο της *Giardia* σε 2 δείγματα κοπράνων ασθενών με λαμβλίαση (έντονη μαύρη γραμμή στη θέση GIAR). (γ) Αρνητικό αποτέλεσμα για αντιγόνο της *Giardia* σε αρνητικό με τη μικροσκοπική εξέταση δείγμα κοπράνων (η γραμμή στη θέση CONT δείχνει την εγκυρότητα της δοκιμασίας).

Πίνακας 1. Κλινική εκδήλωση των ασθενών με λοίμωξη από *Giardia*.

Ασθενείς	Αριθμός ασθενών	Ασυμπτωματικοί	Οξεία διάρροια	Χρονία διάρροια
Έλληνες	29	16 (55,17%)	12 (41,38%)	1 (3,45%)
Αλλοδαποί	32	30 (93,75%)		2 (6,25%)

Πίνακας 2. Αποτελέσματα ανίχνευσης αντιγόνου *Giardia* στα κόπρανα σε σύγκριση με τη μικροσκοπική ανίχνευση του παρασίτου.

Μέθοδος ανίχνευσης αντιγόνου <i>Giardia</i>	Μικροσκοπική ανίχνευση κύστεων και/ή τροφοζωιτών <i>Giardia</i>		
		+	-
ProSpecT <i>Giardia</i>	+	61	
Microplate Assay	-		52
	Ολικά	61	52
		+	-
Giardiasis Ag	+	60	
ELISA	-	1	52
	Ολικά	61	52
		+	-
ColorPAC <i>Giardia</i> / <i>Cryptosporidium</i>	+	59	
	-	2	52
	Ολικά	61	52

$$\text{Ευαισθησία} = \frac{TP}{(TP + FN)}$$

$$\text{Ειδικότητα} = \frac{TN}{(TN + FP)}$$

$$\text{Θετική προγνωστική αξία (PPV)} = \frac{TP}{(TP + FP)}$$

$$\text{Αρνητική προγνωστική αξία (NPV)} = \frac{TN}{(TN + FN)}$$

όπου TP = αληθώς θετικά, TN = αληθώς αρνητικά, FN = ψευδώς αρνητικά και FP = ψευδώς θετικά (πίν. 5).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η λαμβλίαση είναι η πιο κοινή εντερική παρασιτική λοίμωξη στις ΗΠΑ, με 500.000–1.000.000 περιπτώσεις το χρόνο.⁶ Σε παγκόσμια κλίμακα, η λαμβλίαση είναι υπεύθυνη για περίπου 100 εκατομμύρια λοιμώξεις ετησίως.⁷ Στη μελέτη μας, η συχνότητα της λοίμωξης στην Ελλάδα, μαζί με τους αλλοδαπούς, που ζουν μόνιμα ή προσωρινά στη χώρα, βρέθηκε να είναι 1,05% για τους ενήλικες. Το ποσοστό αυτό είναι σαφώς μικρότερο, αν εξαιρεθούν από τη μελέτη οι αλλοδαποί. Παρόλα αυτά, η *Giardia* παραμένει το πρώτο σε συχνότητα παράσιτο

που διαγιγνώσκεται στο Εργαστήριό μας. Οι περισσότερες περιπτώσεις, ιδίως στους ξένους, ήταν ασυμπτωματικές. Οξύ διαρροϊκό σύνδρομο παρατηρήθηκε μόνο στους Έλληνες σε ένα υψηλό ποσοστό (41,38%), ενώ το χρόνιο διαρροϊκό σύνδρομο ήταν σπάνιο και για τις δύο ομάδες ασθενών.

Είναι γνωστό ότι οι κύστες της *Giardia* αποβάλλονται σε κυκλική βάση και ο αριθμός τους μπορεί να ποικίλλει από μέρα σε μέρα. Με τη μικροσκοπική εξέταση δειγμάτων κοπράνων, που συλλέγονται σε διαδοχικές ημέρες ή ακόμα μέσα στο συνιστώμενο χρόνο των 10 ημερών, μπορεί να μη διαγνωστεί η λοίμωξη από το πρωτόζωο αυτό. Σε μερικούς ασθενείς με χρονία διάρροια και δυσαπορρόφηση, το αποτέλεσμα της εξέτασης των κοπράνων είναι επανειλημμένα αρνητικό παρά την ύπαρξη της λοίμωξης.^{8,9} Για όλους αυτούς τους λόγους, πολλοί συγγραφείς τα τελευταία χρόνια εξετάζουν την ευαισθησία και ειδικότητα νέων μεθόδων, που ανιχνεύουν αντιγόνα της *Giardia* στα κόπρανα ανεξάρτητα από την παρουσία κύστεων ή τροφοζωιτών του παρασίτου και που μπορούν να αποτελέσουν εναλλακτικές λύσεις στην κλασική μέθοδο εξέτασης των κοπράνων για ώαρια και παράσιτα. Δημοσιεύσεις^{10,11} με εκτιμήσεις διαφόρων ανοσοενzymικών μεθόδων ανίχνευσης αντιγόνου *Giardia* στα κόπρανα αναφέρουν ευαισθησίες που κυμαίνονται από 94–99%¹⁰ και από 88,6–100%¹¹ και ειδικότητες, αντίστοιχα, 100%¹⁰ και 99,3–100%.¹¹

Στη δική μας μελέτη, η ανοσοενzymική μέθοδος της Alexon (ProSpecT *Giardia* Microplate Assay), η οποία ανιχνεύει το ειδικό για την *Giardia* αντιγόνο GSA-65 στα κόπρανα, συγκρινόμενη με τη μικροσκοπική ανίχνευση του παρασίτου, παρουσίασε ευαισθησία και ειδικότητα 100%. Η υψηλή αυτή ευαισθησία και ειδικότητα για την ίδια εμπορικά διατιθέμενη μέθοδο έχει αναφερθεί και από άλλους συγγραφείς.¹¹ Η ανοσοενzymική μέθοδος της Cypress (Giardiasis Ag ELISA), αν και πολύ ειδική (100%), δεν είναι τόσο ευαίσθητη όσο η μικροσκοπική ανίχνευση του πρωτόζωου (ευαισθησία 98,36%). Η εμπορική αυτή μέθοδος, αν και έχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα και είναι ταχεία στην εκτέλεση (όλα τα στάδια επώασης χρειάζονται 45 min), δεν φαίνεται στη βιβλιογραφία να έχει εκτιμηθεί και από άλλους συγ-

Πίνακας 5. Ευαισθησία, ειδικότητα, θετική προγνωστική αξία (PPV) και αρνητική προγνωστική αξία (NPV) των 3 μεθόδων, σε σύγκριση με τη μικροσκοπική ανίχνευση των κύστεων ή και τροφωζωϊτών της *Giardia*.

Μέθοδοι	Ευαισθησία (%)	Ειδικότητα (%)	PPV (%)	NPV (%)
ProSpecT <i>Giardia</i> Microplate Assay	100	100	100	100
Giardiasis Ag ELISA	98,36	100	100	98,11
ColorPAC <i>Giardia/Cryptosporidium</i>	96,72	100	100	96,29

γραφείς. Η ανοσοχρωματογραφική μέθοδος (ColorPAC *Giardia/Cryptosporidium*) βρέθηκε να έχει τη μικρότερη ευαισθησία (96,72), αφού για δείγματα με μικρές συγκεντρώσεις του αντιγόνου (χαμηλές απορροφήσεις στην ανοσοενzymική μέθοδο) δεν έδωσε ορατή γραμμή. Από άλλους συγγραφείς, η αναφερόμενη ευαισθησία και ειδικότητα είναι 100%.^{12,13}

Οι ανοσοενzymικές μέθοδοι, ιδιαίτερα η ProSpecT *Giardia* Microplate Assay, αν και δεν μπορούν να αντικαταστήσουν τη συνήθη μικροσκοπική ανίχνευση του πρωτόζωου, μπορούν να αποτελέσουν εναλλακτικές και συμπληρωματικές μεθόδους, ιδίως όταν υπάρχει ισχυρή υποψία της νόσου και η πρώτη παρασιτολογική εξέταση των κοπράνων είναι αρνητική. Η μικροσκοπική εξέταση των κοπράνων δεν μπορεί να καταργηθεί ή να αντικατασταθεί, επειδή δίνει πολύτιμες πληροφορίες, όπως την ύπαρξη πυοσφαιρίων, η παρουσία των οποίων, ανάλογα με το ιστορικό και την κλινική εικόνα, κατευθύνει τη διαγνωστική σκέψη προς τη βακτηριακή λοίμωξη από τα γνωστά εντεροπαθογόνα (*Salmonella*, *Shigella* κ.λπ.), τη νοσοκομειακή διάρροια από *C. difficile* ή τις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου (ελκώδη κολίτιδα, νόσο του Crohn). Σε χρόνιες λοιμώξεις με δυσσαπορρόφηση, όπου

η ανεύρεση του παρασίτου είναι δύσκολη και απαιτεί επανειλημμένες συλλογές κοπράνων, η ανίχνευση αντιγόνου με EIAs θα μπορούσε ίσως να συμβάλει στην άμεση διάγνωση και να αντικαταστήσει τα πολλαπλά δείγματα κοπράνων.⁹ Η ανοσοχρωματογραφική θα μπορούσε να αποτελέσει μια ταχεία (το αποτέλεσμα λαμβάνεται σε 10 min) αδρή δοκιμασία (screening test), χωρίς όμως το αρνητικό αποτέλεσμα να αποκλείει τη λοίμωξη, αφού, ως φαίνεται, δεν έχει αρκετή ευαισθησία για χαμηλές συγκεντρώσεις αντιγόνου στα κόπρανα.

Συμπερασματικά, η ανοσοενzymική μέθοδος ProSpecT *Giardia* Microplate Assay, η οποία είναι τόσο ευαίσθητη και ειδική όσο και η μικροσκοπική ανίχνευση του παρασίτου, και κατά δεύτερο λόγο η Giardiasis Ag ELISA, μπορούν να αποτελέσουν εναλλακτικές και συμπληρωματικές μεθόδους της μικροσκοπικής εξέτασης των κοπράνων, ιδιαίτερα σε χρόνια διαρροϊκά σύνδρομα ή σε κλινική υποψία της λαμβλίας, όταν η πρώτη παρασιτολογική εξέταση είναι αρνητική. Η ανοσοχρωματογραφική μέθοδος θα μπορούσε να εφαρμοστεί ως μια ταχεία αδρή δοκιμασία, χωρίς ωστόσο το αρνητικό αποτέλεσμα να αποκλείει τη λοίμωξη.

ABSTRACT

Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assays and one immunochromatographic rapid assay for the detection of *Giardia lamblia*-specific antigens in fecal specimens of patients with giardiasis

K. TZANETOU, E. DOLAPSAKI, C. KAKARI, A. SIDERI, A. BLACHAKI, E. MICHAELIDOU, A. TSOUKNIDA, S. POLITAKI, A. TSANTES, V. PAPAIOANOU, G. MITSAKOU, E. MALAMOU-LADA

Laboratory of Microbiology, "G. Gennimatas" District General Hospital of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2003, 20(3):299-304

OBJECTIVE The estimation of the sensitivity and specificity of two enzyme immunoassays (Alexon-Trend ProSpecT *Giardia* Microplate Assay and Cypress Diagnostics Giardiasis Ag ELISA) and one immunochromatographic assay (Becton Dickinson ColorPAC *Giardia/Cryptosporidium* Rapid Assay) in comparison with microscopic detection of *Giardia* cysts and trophozoites in the patients' fecal specimens, in order to evaluate their usefulness as alternative methods for diagnosing giardiasis. **METHOD** During the last 2.5 years, 5,800 fecal specimens were examined by conventional microscopic examination (direct wet preparation and after concentration) for ova and parasites. All the fecal specimens positive for cysts and/or trophozoites of *Giardia*

using the ova and parasite examination were stored fresh (unpreserved) at -70 °C. These fecal specimens were examined retrospectively for the presence of *Giardia* specific antigens by the 3 methods mentioned above, using the manufacturers' recommended procedures. In addition 52 fecal specimens negative for *Giardia* by ova and parasite examination were tested. **RESULTS** Sixty one fecal specimens (29 from Greek patients and 32 from immigrants) of the 5,800 examined were found positive for *Giardia* by microscopic examination (1.05%). *Giardia* Specific Antigen 65 (GSA 65) was detected in all the 61 positive fecal specimens tested by Alexon ProSpecT *Giardia* Microplate Assay (sensitivity 100%). Two fecal specimens of the 61 (with the lowest absorptions in the Alexon-Trend assay) were found negative tested by the immunochromatographic assay (sensitivity 96.72%), and one also when by the Cypress diagnostic kit (sensitivity 98.36%). The 52 negative samples tested negative in all diagnostic kits (specificity 100%). **CONCLUSIONS** (a) ProSpecT *Giardia* Microplate Assay, which is as sensitive and specific as the microscopic detection of the parasite and secondly Giardiasis Ag ELISA (Cypress Diagnostics) offer alternative or complementary methods to the routine ova and parasite examination, especially in the case of chronic diarrhea or clinical suspicion of giardiasis, when the first microscopic examination of the stool is negative. (b) The ColorPAC *Giardia/Cryptosporidium* Rapid Assay could be applied as a rapid screening test, though a negative result does not firmly exclude the infection.

Key words: Enzyme immunoassay, *Giardia* specific antigens, Giardiasis, Immunochromatographic assay

Βιβλιογραφία

1. TZANETOY K. Λοιμώξεις από παράσιτα. *Αρχ Ελλην Ιατρ* 2002, 19:504–533
2. 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, 16:615–619
3. CARTWRIGHT CP. Utility of multiple-stool-specimen ova and parasite examinations in a high-prevalence setting. *J Clin Microbiol* 1999, 37:2408–2411
4. DANCIGER M, LOPEZ M. Numbers of *Giardia* in the feces of infected children. *Am J Trop Med Hyg* 1975, 24:237–242
5. GARCIA LS, BRUCKNER DA. *Diagnostic medical parasitology*. 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1997
6. FURNESS BW, BEACH MJ, ROBERTS JM. Giardiasis surveillance, United States, 1992–1997. *Morb Mortal Wkly Rep* 2000, 49:1–13
7. KAPPUS K, JURANEK D. *Giardia* in the well. *JAMA* 1988, 259:1810
8. ORTEGA YR, ADAM RD. *Giardia*: Overview and update. *Clin Infect Dis* 1997, 25:545–550
9. TZANETOY K, MANIKA Z, ΔΟΛΑΨΑΚΗ Ε, ΚΑΚΑΡΗ-ΤΣΙΡΟΠΙΝΑ Χ, ΤΣΙΟΔΡΑ Π, ΜΑΛΑΜΟΥ-ΛΑΔΑ Ε ΚΑΙ ΣΥΝ. Βαρύ σύνδρομο δυσαπορρόφησης από *Giardia intestinalis*. *Αρχ Ελλην Ιατρ* 2000, 17:622–626
10. GARCIA LS, SHIMIZU RY. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1997, 36:1526–1529
11. ALDEEN WE, CARROLL K, ROBISON A, MORRISON M, HALE D. Comparison of nine commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1998, 36:1338–1340
12. GARCIA LS, SHIMIZU RY. Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay. *J Clin Microbiol* 2000, 38:1267–1268
13. KATANIK MT, SCHNEIDER SK, ROSENBLATT JE, HALL GS, PROCOP GW. Evaluation of ColorPAC *Giardia/Cryptosporidium* Rapid Assay and ProSpecT *Giardia/Cryptosporidium* Microplate Assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 2001, 39:4523–4525

Corresponding author:

K. Tzanetou, "G. Gennimatas" District General Hospital of Athens, GR-156 69 Papagos, Athens, Greece