



Universidad
Zaragoza



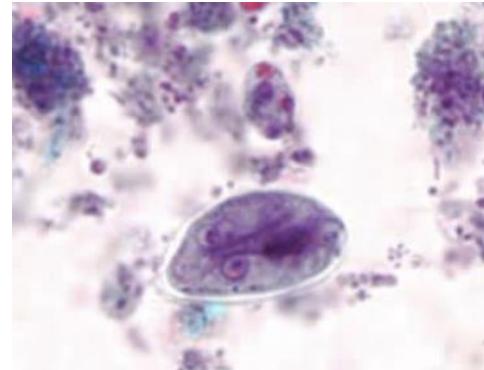
Facultad de Medicina
Universidad Zaragoza

Grado en Medicina

Trabajo Fin de Grado

**EL DIAGNÓSTICO DE LA GIARDIOSIS:
DESDE EL MICROSCOPIO A LAS NUEVAS TECNOLOGÍAS**

Diagnosis of giardiasis: from microscopy to new technologies



Autora: Belén Martínez Malo

Directora: María Pilar Goñi Cepero

Departamento de Microbiología, Pediatría, Radiología y Salud Pública

Área de Parasitología

Curso académico 2022-2023

Sensei: Término en japonés usado como título de honor para tratar con respeto y admiración a un maestro.
Gracias, *Sensei*, por creer en mi cuando yo no lo hago.
Gracias, *Sensei*, por tu apoyo incondicional.

Familia: el mayor regalo que la vida puede darte. Gracias.

Amistad: el tesoro encontrado más preciado. Gracias.

Gracias a mi *Sensei*, gracias a mi familia, gracias a mis amigos.

Y gracias, Pilar, por hacer posible este trabajo y hacer de una asignatura una pasión.

Gracias.

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	2
3. OBJETIVOS	5
4. METODOLOGÍA	6
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7
5.1. Revisión bibliográfica.....	7
5.2. Técnicas de diagnóstico.....	7
5.2.1. OBSERVACIÓN DIRECTA.....	7
5.2.2. INMUNOENSAYOS	11
5.2.2.1. ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS (ELISA).....	12
5.2.2.2. INMUNOCROMATOGRAFÍA (IC)	20
5.2.2.3. INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD).....	23
5.2.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	24
5.2.4. Perspectivas de futuro	34
5.2.4.1. Técnicas de secuenciación masiva	34
6. CONCLUSIONES.....	34
7. BIBLIOGRAFÍA.....	35
8. ANEXOS	
Anexo I. Ciclo vital de <i>Giardia lamblia</i>	
Anexo II. Tabla 2. Comparativa entre los diagnósticos microscópico e inmunoenzimático	
Anexo III. Tabla 3. Comparativa entre los diagnósticos microscópico e inmunocromatografía	
Anexo IV. Tabla 4. Comparativa entre los diagnósticos microscópico y PCR	

1. RESUMEN

La giardiosis es una de las protozoosis entéricas más frecuentes en el mundo, tanto en países desarrollados como en países de baja renta, cuyo agente responsable es *Giardia lamblia*. La giardiosis puede adquirirse tanto por contagio directo como por contagio indirecto. Esta puede presentarse bien como una infección asintomática o bien como una infección sintomática, pudiendo dar lugar a una infección aguda o crónica. La sintomatología consta principalmente de afectación gastrointestinal, si bien es cierto que la giardiosis puede ser causante de complicaciones a nivel extraintestinal. La giardiosis puede afectar a individuos de cualquier edad, pero es en los niños donde esta infección adquiere una mayor relevancia por las implicaciones clínicas que presenta en el retraso del crecimiento y en los síndromes malabsortivos.

Desde que *Giardia lamblia* fue descubierta por primera vez, el diagnóstico de la giardiosis sigue siendo un problema vigente a día de hoy. El método tradicional, que es considerado la técnica de referencia, consiste en la visualización directa, mediante técnicas de microscopía, de quistes y trofozoítos de *Giardia lamblia* en 3 muestras fecales. Debido a su sensibilidad-dependiente del número de muestras, del uso de técnicas de concentración, y de la habilidad del profesional que examina las muestras, se han desarrollado nuevos métodos diagnósticos de giardiosis basados tanto en la detección de antígenos en heces, siendo los principales integrantes de este grupo los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), la inmunocromatografía y la inmunofluorescencia directa, como en técnicas de Biología Molecular, siendo su máximo exponente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Todos los métodos diagnósticos nombrados presentan una serie de ventajas y de inconvenientes, por lo que para su elección será imprescindible tener en cuenta las características de cada uno de ellos referentes a sensibilidad y especificidad, falsos positivos y negativos, costo, tiempo, profesionales requeridos para su realización y población en la que se vaya a aplicar la técnica diagnóstica.

Abstract

Giardiasis is one of the most common enteric protozooses in the world, both in developed countries and low-income countries, and it is caused by *Giardia lamblia*. Giardiasis can be acquired either direct transmission or indirect transmission. It can present either as an asymptomatic infection or as a symptomatic infection, which can lead to acute infection or chronic infection. Symptomatology consists mainly of gastrointestinal involvement, although giardiasis can cause extraintestinal complications. Giardiasis can affect individuals of any age, but it is in children where this infection is most relevant because of its clinical implications in growth retardation and malabsorptive syndromes.

Since *Giardia lamblia* was first discovered, the diagnosis of giardiasis remains an ongoing problem today. The traditional method, which is considered the gold standard, consists of direct view of *Giardia lamblia* cysts and trophozoites in 3 fecal samples by microscopy techniques. Due to its dependent-sensitivity on the number of samples examined, the use of concentration techniques and the skill of the professional who examines the samples, new methods for the diagnosis of giardiasis have been developed, based both on the detection of *Giardia* antigens in faeces, being the main members of this group enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), immunochromatography and direct immunofluorescence, and Molecular Biology techniques, being its maximum exponent the polymerase chain reaction (PCR). All diagnostic methods mentioned have advantages and disadvantages, and in order to choose one, it is essential to consider the characteristics of each one of them in terms of sensitivity and specificity, false positives and false negative, cost, time, professionals required to perform them and the population in which the diagnostic technique is to be applied.

2. INTRODUCCIÓN

Giardia lamblia, también conocida como *Giardia duodenalis* o *Giardia intestinalis*, es un protozoo flagelado intestinal perteneciente a la familia *Diplomonadida*, que fue descubierto en 1681 por Antonie van Leeuwenhoek cuando observaba sus propias heces. *Giardia lamblia* se presenta en dos formas: trofozoito (Figura 1) y quiste (Figura 2). La primera es la forma invasiva y la segunda la forma de resistencia y también la forma infectante (Díaz-Carbonell y col., 1996; Schunk y col., 2001).

De distribución cosmopolita y responsable de la giardiosis, se trata del protozoo flagelado más frecuentemente causante de diarrea en humanos y de una de las protozoosis entéricas más frecuentes en el mundo, tanto en países desarrollados como en países de baja renta (Rosenblatt y col., 1993; Winiecka-Krusnell y col., 1995; Behr y col., 1997; Mank y col., 1997; Hanson y col., 2001; ten Hove y col., 2007; Korzeniewski y col., 2016). Alrededor de 280 millones de personas en todo el planeta, residentes en países de clima y desarrollo socioeconómico muy diferentes, padecen esta parasitosis (El-Nahas y col., 2013; Jahan y col., 2014). No obstante, la incidencia de la giardiosis es mayor en los países de baja renta, ya que aproximadamente mil millones de personas de dichas naciones están infectados, según la OMS. Así, en Asia, África y América Latina, alrededor de 200 millones de personas desarrollan manifestaciones clínicas a causa de la giardiosis y cada año son reportados 500 mil casos nuevos (Sahagún y col., 2008). Sin embargo, los países desarrollados no han escapado de esta parasitosis, y en ellos, en el presente, se reconoce como una enfermedad re-emergente. Desde el año 2004 la giardiosis fue incluida en la Iniciativa de Enfermedades Desatendidas de la OMS (El-Nahas y col., 2013) y se encuentra incluida en la lista de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria (BOE 27 de marzo de 2015).

Giardia lamblia presenta 7 **genotipos** diferentes, genotipos que son denominados de la A a la G (Calderaro y col., 2010; Hawash y col., 2016). Los genotipos responsables de la giardiosis en humanos se corresponden principalmente con el A y el B, aunque en el año 2008 se identificó por primera vez el genotipo E en humanos (Sahagún y col., 2008; Calderaro y col., 2010; Hawash y col., 2016). El genotipo A se ha subdividido a su vez en 2 subgenotipos, el A1 específico del ser humano y el A1I encontrado tanto en humanos como en animales. En Zaragoza se han descrito los genotipos A1I, B y mixtos (personas infectadas por ambos genotipos simultáneamente) (Sahagún y col., 2008).

La infección puede adquirirse tanto por **contagio directo** interpersonal (contaminación oral-fecal) como por **contagio indirecto** a través del agua o de los alimentos (este último más raro) (Ungar y col., 1984; Goldin y col., 1991; Elkadi y col., 1992; Rosenblatt y col., 1993; Díaz-Carbonell y col., 1996; Schunk y col., 2001; Jahan y col., 2014; Van den Bossche y col., 2015; Silva y col., 2016; Korzeniewski y col., 2016; Soares y col., 2016).

El **ciclo vital** de la giardiosis (Anexo I) comienza con la ingestión de quistes de *Giardia lamblia* presentes en el agua, en los alimentos o en las manos contaminadas; una vez ingeridos los quistes, estos inician su desenquistamiento en el estómago y lo terminan en el duodeno, produciéndose así la salida de los trofozoítos; estos trofozoítos colonizan el duodeno y el yeyuno, posteriormente son arrastrados y en el intestino se produce el enquistamiento de los mismos, saliendo los quistes, que son infectantes, con las heces (Díaz-Carbonell y col., 1996; Soares y col., 2016).

La **patogenia** de la giardiosis se produce tanto por una serie de mecanismos que dañan la mucosa como por una serie de factores luminales. Entre los primeros se encuentra la adherencia de los trofozoítos de *Giardia* a la superficie del epitelio intestinal mediante su disco adhesivo (que actúa de ventosa), la secreción de proteasas que rompen las uniones intercelulares del epitelio intestinal y la inducción de apoptosis de los enterocitos mediante las moléculas liberadas por *Giardia*, lo cual produce una pérdida de la función de barrera epitelial, con un aumento de la permeabilidad intestinal y malabsorción de nutrientes, sodio y agua e hipersecreción de cloro y deficiencia de disacaridasas. Entre los factores luminales se encuentra el consumo de las sales biliares por los trofozoítos, lo que lleva a la disminución de las sales biliares en el intestino y con ello a la disminución de la actividad de la lipasa pancreática y a la dificultad de solubilización de las grasas, lo cual contribuye a su vez a la malabsorción de las grasas. Todos estos factores lesivos pueden dar lugar a diarrea, malabsorción y, en ocasiones, manifestaciones extraintestinales.

El periodo de incubación de la giardiosis es de 1-2 semanas, con una media de 9 días; tras el mismo, la giardiosis puede presentarse clínicamente como una infección asintomática o como una infección sintomática (Dutt y col., 1991; Díaz-Carbonell y col., 1996; Stark y col., 2011; Nguyen y col., 2012; Hawash y col., 2016; Korzeniewski y col., 2016). La **infección asintomática** es la forma más común de giardiosis y ocurre tanto en niños como en adultos; esta forma de infección puede presentar síntomas inespecíficos y en ella influyen una serie de factores como son el genotipo del parásito (siendo el genotipo B el más frecuente en nuestro medio) así como factores relacionados con el hospedador (estado inmunológico, infecciones previas, etc) (Díaz-Carbonell y col., 1996; Soares y col., 2016). En lo que respecta a la **infección sintomática**, su periodo de

incubación es variable, pudiendo oscilar entre una y cuatro semanas, en función de la virulencia de la cepa de *Giardia lamblia* implicada y de la capacidad de respuesta que posea el hospedador (estado nutricional, otras enfermedades concomitantes contactos previos con la propia *Giardia lamblia*, estado inmunológico ...) (Ungar y col., 1984; ten Hove y col., 2007). La forma de infección sintomática de giardiosis puede presentarse a su vez en 2 formas diferentes: infección sintomática aguda e infección sintomática crónica (Schunk y col., 2001; Calderaro y col., 2010; Stark y col., 2011; Hawash y col. 2016). La forma de **giardiosis aguda** ha sido estudiada típicamente en personas viajeras a zonas endémicas de la misma; clínicamente se presenta a los 3-20 días de la llegada de dichas zonas con diarrea consistente en heces pastosas, amarillentas, mucosas y esteatorreicas, pérdida de peso y molestias abdominales, anorexia, náuseas, vómitos y flatulencias, autolimitándose a las 2-4 semanas (Calderaro y col., 2010). La forma de **giardiosis crónica** se presenta también con diarrea, siendo esta crónica y esteatorreica, con heces abundantes, malolientes y sin sangre; no obstante, el dolor y los cólicos abdominales pueden ser el síntoma predominante de esta forma; también se acompaña de malestar, náuseas y anorexia. Debido a su carácter crónico, la giardiosis crónica puede presentar trastornos en la absorción de grasas, proteínas, azúcares, vitamina A, vitamina B12, ácido fólico y lactosa (este último caso debido a una deficiencia secundaria de lactasa). Es por ello que los pacientes que padecen dicha infección pueden presentar en suero niveles bajos de vitamina B12, magnesio, hierro y zinc, anemia por deficiencia de ácido fólico y en el 10-20% de los casos se puede producir una pérdida de peso (Elkadi y col., 1992; Díaz-Carbonell y col., 1996). Esta forma de giardiosis crónica puede durar meses o años si no se trata; no obstante, hay síntomas que pueden permanecer pese a ser tratada, como son las diarreas debido a una digestión lenta de las grasas y/o intolerancia a la lactosa por la baja actividad residual de las disacaridasas intestinales (Díaz-Carbonell y col., 1996).

El conocido como **Síndrome del intestino irritable post-infeccioso** se ha asociado con la infección por *Giardia*, y consiste en molestias o dolor abdominal y alteraciones del ritmo intestinal con diarrea y estreñimiento; esta complicación podría presentarse tras la giardiosis debido a la inflamación intestinal, al aumento de la motilidad y de la permeabilidad intestinal, a la predisposición genética y a las alteraciones en la microbiota intestinal. El retraso en el diagnóstico y en el tratamiento de la giardiosis aumenta el riesgo de padecer esta complicación.

La giardiosis también puede ser causante de **complicaciones a nivel extraintestinal**, pudiendo producir fenómenos alérgicos (de tipo alimentario, urticaria o prurito), artritis (debido a que antígenos de bacterias entéricas han sido encontrados en el líquido sinovial de las articulaciones afectas, posiblemente debido a un aumento de la permeabilidad intestinal), retinitis (ya que las alteraciones oculares podrían ser debidas al depósito de antígenos de *Giardia* en las capas de la retina con la subsiguiente formación de inmunocomplejos), retraso del crecimiento (por la malabsorción intestinal) y alteración de la función cognitiva (por la malabsorción intestinal y deficiencia de hierro, zinc y vitaminas A y B12).

Aunque la giardiosis puede afectar a individuos de cualquier edad, es en los **niños** donde esta infección adquiere una mayor relevancia debido a las implicaciones clínicas que tiene en el retraso del crecimiento y en los síndromes malabsortivos, y a su vez, son los propios centros de cuidado infantil e instituciones similares donde se aúnan las condiciones ideales para producirse el contagio directo de la giardiosis (Ungar y col., 1984; Goldin y col., 1991; Dutt y col., 1991; Elkadi y col., 1992; Rosenblatt y col., 1993; Díaz-Carbonell y col., 1996; Schuurman y col., 2007; Nguyen y col., 2012; Silva y col., 2016; Soares y col., 2016).

El **diagnóstico** de la giardiosis puede realizarse mediante métodos directos y métodos indirectos. Mientras que los métodos directos pueden demostrar la presencia de *Giardia lamblia* tanto en heces como en el jugo duodenal (Ungar y col., 1984; Janoff y col., 1989; Gaafar, 2011), los métodos indirectos se basan en la detección de antígenos y/o en la amplificación y detección de ADN de *Giardia* en heces (Díaz-Carbonell y col., 1996; ten Hove y col., 2007; Gutiérrez-Cisneros y col., 2011; Nguyen y col., 2012; Jahan y col., 2014).

El diagnóstico de la giardiosis ha evolucionado con el tiempo, desde la tradicional microbiología a las más modernas técnicas de Biología Molecular. El análisis de estas técnicas de diagnóstico constituye el objeto de este estudio. Esta evolución está motivada por la dificultad que supone la observación de las muestras al microscopio y por la necesidad de encontrar una metodología objetiva que no se vea influenciada por las habilidades del observador, que sea rápida y a ser posible que sea económicamente rentable.

Para el **tratamiento** de la giardiosis se dispone de varias opciones farmacológicas, como son Metronidazol (siendo su desventaja la aparición de resistencias), Tinidazol (siendo su ventaja la posología en dosis única), Albedazol y Nitazoxanida; en el caso de las gestantes con giardiosis de dispone de Paromomicina.

En todas las infecciones transmisibles es importante llevar a cabo una correcta **profilaxis** para evitar los contagios, no siendo la giardiosis diferente en este aspecto. La profilaxis de la misma se puede llevar a cabo a 2 niveles, tanto en la fuente de infección como en los mecanismos de transmisión. Para evitar contraer la giardiosis por parte de fuente de infección es imprescindible realizar un correcto diagnóstico con su correspondiente tratamiento. La profilaxis a nivel de los mecanismos de transmisión depende de si estos son directos o indirectos: para evitar la infección a través de mecanismos directos es fundamental la existencia de una educación sanitaria adecuada y en el caso de los mecanismos indirectos es primordial el lavado de manos, la protección de los alimentos y la filtración y ebullición del agua, ya que la simple cloración de la misma es ineficaz. Además, desde el año 1999 se encuentra disponible en el mercado una vacuna comercial frente a *Giardia lamblia* para perros y gatos.

Desde que *Giardia lamblia* fue descubierta por primera vez, el diagnóstico correcto de la giardiosis sigue siendo un problema real a día de hoy, tanto para los médicos como para los profesionales de laboratorio. Para evitar su transmisión, no sólo es suficiente con llevar a cabo las correctas medidas higiénicas, sino que es imprescindible realizar un correcto diagnóstico que permita proporcionar así el tratamiento adecuado. El retraso en el diagnóstico de la giardiosis favorece su diseminación, a la vez que retrasa el tratamiento. Todo ello, proporciona una serie de implicaciones clínicas negativas sobre la salud del paciente, que pueden ser desde leves, hasta realmente graves. Es por ello que los métodos de detección de giardiosis deben proporcionar el más alto nivel de sensibilidad y especificidad, evitándose los falsos positivos y negativos. Por otra parte, la elección del método diagnóstico más adecuado debe basarse en una combinación de factores, como son el rendimiento de la prueba, el coste, el tiempo y la población de pacientes sobre los que la prueba va a ser realizada. Todos somos conscientes de la necesidad creciente y urgente de desempeñar una buena práctica clínica en lo que respecta al uso de los antibióticos y antimicrobianos en general, pero no todos somos conscientes de la necesidad de aplicar los métodos diagnósticos correctos.

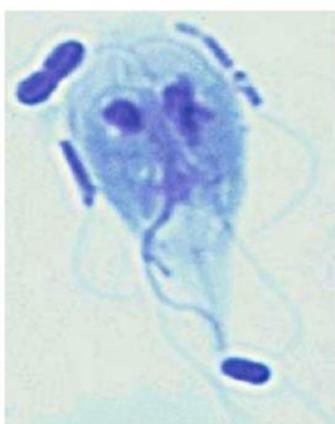


Figura 1. Trofozoíto de *Giardia lamblia*.



Figura 2. Quiste de *Giardia lamblia*.

3. OBJETIVOS

Objetivo principal

Revisar las técnicas disponibles para el diagnóstico de la giardiosis, comparando su utilidad para la rutina de laboratorio de Parasitología.

Objetivos específicos

1. Revisar las técnicas más utilizadas, en lo que respecta a su sensibilidad, especificidad, falsos positivos y negativos.
2. Revisar las ventajas e inconvenientes de cada técnica en tiempo, costo y dificultad.

3. Determinar la utilidad práctica de cada una de las técnicas.

4. METODOLOGÍA

Se realizó una revisión de la literatura científica disponible hasta mayo de 2023, sin restringir por idioma, fecha de publicación o factor de impacto para evitar así el sesgo de selección.

Los términos empleados en la búsqueda fueron los siguientes:

- “*Giardia lamblia*”
- “*Giardia*”
- “*Diagnosis*”
- “*Genotype*”
- “*Genotyping*”
- “*Immunochromatography*”

La base de datos bibliográfica empleada para llevar a cabo esta revisión fue **MEDLINE**, empleando **PubMed** como motor de búsqueda. Para conseguir los términos que formarían parte de las ecuaciones de búsqueda se usaron **Descriptores** en Ciencias de la Salud en inglés, con el objetivo de obtener así un vocabulario estructurado en dichas ecuaciones. Las ecuaciones de búsqueda fueron las siguientes:

- **(*Giardia lamblia*) AND (*Diagnosis*)**, la cual se obtuvo de la siguiente manera: se seleccionó la opción de búsqueda avanzada de PubMed (“Advanced”), una vez ahí, se añadió el descriptor “*Giardia lamblia*”, se seleccionó el operador booleano “AND” y acto seguido se añadió el descriptor “*Diagnosis*”.
- **(*Giardia*[Title]) AND (*Genotype*[Title])**, la cual se obtuvo de la siguiente manera: se seleccionó la opción de búsqueda avanzada de PubMed (“Advanced”), una vez ahí, se añadió el descriptor “*Giardia*”, se seleccionó el operador booleano “AND” y acto seguido se añadió el descriptor “*Genotype*”; para finalizar la búsqueda se seleccionó la opción “Title” para conseguir así que ambos términos de la ecuación apareciesen en los títulos de los artículos.
- ***Giardia*[Title]) AND (*Genotyping*[Title])**, la cual se obtuvo de la siguiente manera: se seleccionó la opción de búsqueda avanzada de PubMed (“Advanced”), una vez ahí, se añadió el descriptor “*Giardia*”, se seleccionó el operador booleano “AND” y acto seguido se añadió el descriptor “*Genotyping*”; para finalizar la búsqueda se seleccionó la opción “Title” para conseguir así que ambos términos de la ecuación apareciesen en los títulos de los artículos.
- **(*Immunochromatography*) AND (*Giardia*)**, la cual se obtuvo de la siguiente manera: se seleccionó la opción de búsqueda avanzada de PubMed (“Advanced”), una vez ahí, se añadió el descriptor “*Immunochromatography*”, se seleccionó el operador booleano “AND” y acto seguido se añadió el descriptor “*Giardia*”.

Con objeto de añadir una breve reseña acerca de las técnicas de secuenciación masiva en el diagnóstico de *Giardia lamblia*, se hizo una búsqueda utilizando “**Técnicas de Secuenciación Masiva en el diagnóstico de Giardia**”. De esta forma se accedió a la Sociedad Española de Medicina de Laboratorio y a la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Criterios de inclusión:

- Estudios en los que se llevan a cabo comparaciones entre los distintos métodos diagnósticos de *Giardia lamblia*.
- Estudios realizados sobre el diagnóstico de *Giardia lamblia* en diferentes poblaciones diana.
- Estudios en los que se añaden al diagnóstico de *Giardia lamblia* otros parásitos intestinales.

Criterios de exclusión:

- Estudios de diagnóstico de *Giardia lamblia* realizados en animales.
- Estudios de diagnóstico de *Giardia lamblia* realizados en el medio ambiente.
- Estudios de diagnóstico de diagnóstico de *Giardia lamblia* basados en la comparación exclusiva de marcas comerciales de tests diagnósticos.

- Estudios de diagnóstico de *Giardia lamblia* en los que no se compara con un “gold standard” o técnica de referencia.

La **selección de los artículos** se llevó a cabo en 3 fases, aplicando los criterios de inclusión y de exclusión en cada una de las 3 fases que formaron parte del proceso de selección. Dichas fases fueron las siguientes:

1. Selección de los artículos atendiendo al título.
2. Selección de los artículos según la información aportada en el “abstract” o resumen.
3. Selección de los artículos tras la lectura completa de los mismos.

En el caso de los artículos en los que el resumen no estaba disponible, estos pasaban a la tercera fase de la selección al no ser posible realizar en ellos la segunda fase del proceso.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Revisión bibliográfica

En la presente revisión se ha empleado un número total de **51 artículos** científicos. En la Tabla 1 se expone el proceso de selección y los resultados de los mismos.

Tabla 1. Resultados de la búsqueda bibliográfica.

Ecuación de búsqueda	Resultados	Artículos seleccionados tras leer el título	Artículos seleccionados tras leer el resumen	Artículos finales empleados
(Giardia lamblia) AND (Diagnosis)	2.042	276	130	44
(Giardia[Title]) AND (Genotype[Title])	36	7	4	1
(Giardia[Title]) AND (Genotyping[Title])	138	23	9	1
(Immunochemistry) AND (Giardia)	79	5	4	3
“Técnicas de Secuenciación Masiva en el diagnóstico de <i>Giardia</i> ”				2

5.2. Técnicas de diagnóstico

Los parásitos acompañan al hombre a lo largo de la historia, prácticamente desde el inicio de la humanidad, siendo los arquezoos, carentes de ribosomas, como *Giardia* los considerados más antiguos. Estos protozoos con transmisión directa se han difundido entre hombres y animales con relativa facilidad y todavía constituyen un auténtico problema en los países de baja renta debido al hacinamiento y a las condiciones higiénicas de la población, donde hacen mella sobre todo en la salud de los niños. En los países desarrollados, la implantación de procesos de depuración y potabilización de aguas, junto con unos hábitos higiénicos más depurados, han ayudado a disminuir la transmisión de estas parasitosis, hasta el punto en que en algunos colectivos se piensan erradicadas. No obstante, la capacidad de estos parásitos de utilizar portadores asintomáticos, la presencia de personas con síndrome de diarrea crónica y la aplicación de las técnicas de Biología Molecular al diagnóstico parasitológico parecen poner en duda dicha idea. Es por ello, que en esta revisión narrativa se revisan las técnicas utilizadas para el diagnóstico de la giardiosis, siguiendo aproximadamente el camino de su evolución.

5.2.1. OBSERVACIÓN DIRECTA

La observación directa al microscopio constituye la más antigua de las técnicas, ya utilizada por Antonie van Leeuwenhoek, cuando su interés por la microscopía y la Biología le llevó a observar *Giardia* en sus heces.

La tecnología de los microscopios ha cambiado mucho desde entonces, aunque la microscopía sigue siendo la técnica más estimada por los parasitólogos.

El análisis microscópico de las muestras fecales es considerado el “gold standard” o técnica de referencia en el diagnóstico de la giardiosis, basada en la identificación de los quistes (Figura 1) o trofozoítos (Figura 2) de *Giardia lamblia* en muestras de heces y admite múltiples variaciones, según se pueda efectuar un pretratamiento o una tinción de la muestra (Ungar y col., 1984; Janoff y col., 1989; Dutt y col., 1991; Elkadi y col., 1992; Aldeen y col., 1995; Díaz-Carbonell y col., 1996; Mank y col., 1997; Hanson y col., 2001; Schunk y col., 2001; Verweij y col., 2003; ten Hove y col., 2007; Schuurman y col., 2007; ten Hove y col., 2009; Stark y col., 2011; Gutiérrez-Cisneros y col., 2011; Gaafar, 2011; Nguyen y col., 2012; Nazeer y col., 2013; Elsafi y col., 2013; Jahan y col., 2014; Banisch y col., 2015; Sadaka y col., 2015; Hawash y col., 2016; Luade y col., 2016; Korzeniewski y col., 2016; Silva y col., 2016; Soares y col., 2016; Batra y col., 2016; Akgun y col., 2020).

La sensibilidad del diagnóstico microscópico depende del número de muestras examinadas, del uso de técnicas de concentración, así como de la habilidad del profesional que examina dichas muestras. Esta suma de factores, lleva a un fallo en la detección del parásito en el 30-50% de los casos sospechosos de giardiosis, con una sensibilidad que oscila entre el 50-70% (Ungar y col., 1984; Janoff y col., 1989; Dutt y col., 1991; Chaudhuri y col., 1991; Elkadi y col., 1992; Rosenblatt y col., 1993; Aldeen y col., 1995; Winiecka-Krusnell y col., 1995; Díaz-Carbonell y col., 1996; Mank y col., 1997; Schunk y col., 2001; Verweij y col., 2003; Vidal y col., 2005; ten Hove y col., 2007; Schuurman y col., 2007; ten Hove y col., 2009; Gutiérrez-Cisneros y col., 2011; El-Nahas y col., 2013; Nazeer y col., 2013; García-Bujalance y col., 2013; Van Lint y col., 2013; Mejia y col., 2013; Jahan y col., 2014; Banisch y col., 2015; Sadaka y col., 2015; Van den Bossche y col., 2015; Hawash y col., 2016; Korzeniewski y col., 2016; Soares y col., 2016; Batra y col., 2016; Akgun y col., 2020).

Existe también otro aspecto que limita la sensibilidad del examen microscópico, siendo este el período de prepatencia de la giardiosis (Díaz-Carbonell y col., 1996). Se denomina periodo de prepatencia al tiempo transcurrido desde la infección por *Giardia lamblia* hasta la aparición del parásito en las heces, siendo este tiempo aproximadamente de 2-3 semanas, mientras que el periodo de incubación suele ser de 1-2 semanas, pudiendo dar así resultados falsos negativos en los estadios iniciales de la giardiosis, ya que los síntomas de giardiosis se pueden presentar una semana antes de que la detección del parásito sea posible (Ungar y col., 1984; Díaz-Carbonell y col., 1996).

Giardia lamblia presenta patrones variables de excreción en heces, lo cual puede causar resultados falsos negativos; es por ello que la sensibilidad del diagnóstico por microscopía puede verse reducida debido a la presencia intermitente del parásito en la muestra de heces o por el bajo número del mismo presente en la muestra. En lo referente a la variabilidad de excreción de los quistes, se han descrito periodos de varios días en los que la eliminación de quistes es nula (Chaudhuri y col., 1991; Addiss y col., 1991; Elkadi y col., 1992; Winiecka-Krusnell y col., 1995; Díaz-Carbonell y col., 1996; Hanson y col., 2001; Gaafar, 2011; Nguyen y col., 2012; Elsafi y col., 2013; Jahan y col., 2014; Korzeniewski y col., 2016; Silva y col., 2016; Soares y col., 2016).

Por otra parte, el uso de métodos de diagnóstico de rutina como son la concentración y la tinción con hematoxilina férica (Figura 3 y Figura 4) o la tinción acidorresistente modificada, pueden ser insuficientes para demostrar la presencia de *Giardia lamblia* (Winiecka-Krusnell y col., 1995; Sadaka y col., 2015). Incluso tras haber examinado 6 muestras, estas pueden no revelar la presencia de *Giardia*, por lo que no se puede excluir dicha parasitosis pese a la negatividad persistente de los resultados (v y col., 1996). De hecho, algunos autores han llegado a sugerir que podría ser necesario examinar 6 o más muestras durante 2-4 semanas (Rosenblatt y col., 1993). Sin embargo, esta propuesta no parece viable para todos los casos de sospecha de giardiosis en los actuales sistemas de salud, sobre todo por el alto coste en personal, tiempo y material que ello implicaría.

Por todo lo mencionado, para realizar el análisis de heces por microscopio a día de hoy se requiere, al menos, 3 muestras fecales recogidas en días alternos en no más de 10 días para evitar resultados falsos negativos en el examen microscópico (Janoff y col., 1989; Goldin y col., 1991; Addiss y col., 1991; Elkadi y col., 1992; Rosenblatt y col., 1993; Díaz-Carbonell y col., 1996; Schunk y col., 2001; Vidal y col., 2005; Nguyen y col., 2012; El-Nahas y col., 2013; García-Bujalance y col., 2013; Elsafi y col., 2013; Jahan y col., 2014; Sadaka y col.,

2015; Van den Bossche y col., 2015; Laude y col., 2016; Korzeniewski y col., 2016; Silva y col., 2016; Soares y col., 2016). Teniendo en cuenta este último detalle, cabe decir que en un estudio llevado a cabo por el laboratorio de parasitología de la Facultad de Medicina de San Pablo (Brasil) se apreció un incremento del rendimiento diagnóstico del 11,3% para *Giardia lamblia* cuando se examinaron 3 muestras de heces en vez de únicamente una sola muestra (Vidal y col., 2005). Es importante analizar al menos 3 muestras fecales, ya que según se ha descrito, se pueden obtener hasta un 15% de falsos negativos incluso analizando esas 3 muestras (Elkadi y col., 1992).

Obtener al menos 3 muestras de heces en diferentes días puede ser engoroso, costoso y mal logrado en la realidad por parte de los pacientes (Díaz-Carbonell y col., 1996; Gaafar, 2011; Elsafi y col., 2013). Además, en los países en desarrollo, las personas con bajos ingresos suelen referir dificultades para poder entregar al laboratorio más de una muestra de heces, lo cual hace que no siempre se puedan analizar esas 3 muestras necesarias para minimizar el error del diagnóstico microscópico, lo que a su vez se traduce en un efecto negativo en la sensibilidad microscópica (Winiecka-Krusnell y col., 1995; El-Nahas y col., 2013; Silva y col., 2016).



Figura 3. Muestra de heces teñida con hematoxilina férrica que muestra quiste de *Giardia lamblia* con núcleo evidente y axostilo (x1000) (Sadaka y col., 2015).

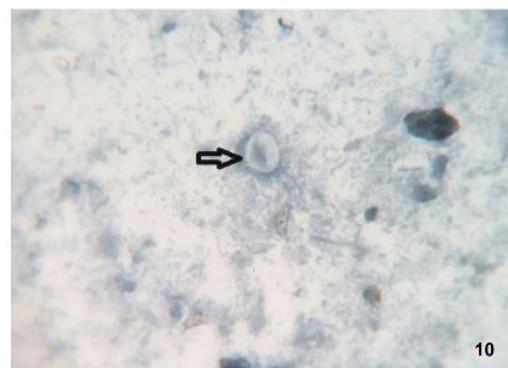


Figura 4. Muestra teñida con hematoxilina férrica que muestra quiste de *Giardia lamblia* (x1000) (Sadaka y col., 2015).

Tratamiento de las muestras

En los países en los que no se dispone de los medios adecuados, que además por sus condiciones higiénicas y socio-sanitarias, suelen coincidir con aquellos donde la giardiosis es endémica, el diagnóstico de la misma puede llevarse a cabo a partir de una suspensión de la muestra en suero fisiológico (Figura 5) para posteriormente teñirlo con lugol (Figura 6). En estos casos, aumentando el número de preparaciones observado de cada muestra, así como el número de analistas que examinan cada una, se puede llegar a aumentar la sensibilidad. En general, supone un esfuerzo ímparo en el que el número de analistas y el tiempo utilizado encarecen la prueba diagnóstica.

En 1938 se describió por primera vez la concentración de las muestras mediante sulfato de zinc, pero pronto fue modificada (Gotfred-Rasmussen y col., 2016). Fue 10 años más tarde, en el 1948, cuando se describió la técnica de concentración de las muestras fecales con formol-éter (FE), que es la más utilizada en la actualidad en los países desarrollados. Ambos métodos de concentración, la flotación con FE y con sulfato de zinc, se compararon en 2 estudios resultando igual de sensibles. Desde entonces, el uso del FE ha sido sustituido por el acetato de etilo sin producir ningún cambio en la sensibilidad (Gotfred-Rasmussen y col., 2016). La técnica de flotación en sal y azúcar (FSS) es una alternativa a la técnica de concentración de formol-acetato de etilo (FAE), y ofrece ventajas respecto a la FAE, ya que las muestras concentradas por FSS pueden ser analizadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), lo que resulta en una mayor sensibilidad por parte de la FSS; sin embargo, la FSS es más laboriosa que la FAE, motivo por el cual pude ser menos aceptada como método de concentración en los laboratorios diagnósticos (Gotfred-Rasmussen y col., 2016).

En un estudio llevado a cabo en Wadihaloo (Emiratos Árabes Unidos) por Elkadi y col., en 1992, se analizaron 1.719 muestras de 68 niños y compararon los resultados obtenidos por 3 técnicas diagnósticas: análisis microscópico en muestras de heces frescas, análisis microscópico en muestras de heces concentradas con formalina y posteriormente teñidas con lugol y ELISA (Elkadi y col., 1992). En lo que se refiere al análisis microscópico, los resultados mostraron detección de *Giardia* en el 8,84% de las muestras de heces frescas, mientras que esta detección aumentó hasta el 14,72% de las muestras de heces concentradas con formalina y posteriormente teñidas con lugol, pudiendo destacar así el mayor rendimiento diagnóstico por parte de la microscopía en las muestras fecales que son sometidas a procesos de concentración y tinción (Elkadi y col., 1992). En el estudio de 1997 de Behr y col. también se describe el beneficio de la conservación de las muestras fecales con acetato de sodio, ácido acético y formalina en el diagnóstico de protozoos intestinales, *Giardia lamblia* entre ellos, y se expone a su vez un rendimiento mayor en el diagnóstico microscópico con la concentración de las muestras fecales conservadas, aumentando todavía un 20% en la detección cuando se realiza la tinción de la preparación (Behr y col., 1997).

En 2014, Jahan y col. analizaron 1.680 muestras fecales de pacientes, procedentes de Lucknow (India), con diarrea y otra sintomatología gastrointestinal. Las técnicas utilizadas fueron tres: análisis microscópico directo, análisis microscópico en muestras teñidas tras concentración de las mismas, y un test comercial de ELISA (RIDASCREEN®). La microscopía proporcionó la detección de *Giardia lamblia* en 260 muestras con la visión directa, aumentando a su detección en 268 muestras usando muestras concentradas y teñidas (Jahan y col., 2014). Esto supone un aumento de la detección de casi el 3% si las muestras son sometidas a procesos de concentración y tinción (Jahan y col., 2014).

Sin embargo, también existen estudios que muestran lo contrario, como es el estudio de casos y controles llevado a cabo por Nazeer y col., en 2013, en el que se analizaron 396 muestras de 396 paciente afectos de diarrea (casos) y 202 muestras de 202 pacientes aparentemente sanos (controles) mediante 3 técnicas: análisis microscópico directo, análisis microscópico tras concentración con formol-éter y PCR en tiempo real. Dichos autores, al no encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los dos métodos de microscopía, concluyeron que la concentración previa de la muestra no supone una mejora significativa del método (Nazeer y col., 2013). Considerando que la concentración de las muestras supone analizar una mayor cantidad de muestra, con la ventaja de que además las formas parasitarias más frágiles quedan fijadas y de que se eliminan una gran cantidad de artefactos, es difícil no tener reservas con sus conclusiones. El problema que presenta esta técnica de concentración es que la muestra concentrada no se puede utilizar para técnicas posteriores de Biología Molecular, como se comentará más delante de la revisión (Gotfred-Rasmussen y col., 2016). Por lo tanto, el examen microscópico consiste, generalmente, en concentrar la muestra y en realizar posteriormente una tinción, siendo la más empleada la tinción con lugol (Figura 5). Así, el tiempo requerido por el observador para analizar las muestras por microscopía es de aproximadamente 20-30 minutos por muestra (Aldeen y col., 1995).

Como se puede apreciar, es una técnica laboriosa y que requiere de tiempo para su realización; sin embargo, esta se considera una prueba económica y rápida para el diagnóstico de la giardiosis, y ofrece otra ventaja importante, como es la detección simultánea de otros parásitos distintos a *Giardia lamblia* en una misma muestra de heces. También se considera la prueba “gold estándar” de referencia para la comparación de otras técnicas. (Ungar y col., 1984; Addiss y col., 1991; Aldeen y col., 1995; Verweij y col., 2003; ten Hove y col., 2007; ten Hove y col., 2009; Gutiérrez-Cisneros y col., 2011; Gaafar, 2011; Elsaifi y col., 2013; Jahan y col., 2014; Banisch y col., 2015; Sadaka y col., 2015; Van den Bossche y col., 2015; Laude y col., 2016; Korzeniewski y col., 2016; Silva y col., 2016; Soares y col., 2016).



Figura 5. Frotis de muestra en solución salina que muestra un quiste de *Giardia lamblia* (x400) (Sadaka y col., 2015).



Figura 6. Frotis de muestra de heces teñida con lugol que muestra un quiste de *Giardia lamblia* (x400) (Sadaka y col., 2015).

En la actualidad, la toxicidad del formaldehído hace que su uso en análisis de rutina sea poco deseable, motivo por el cual se persigue su eliminación. Esto ha hecho que se estén desarrollado diferentes alternativas que implican desde la disminución del tamaño de los kits proporcionados hasta su sustitución por otros líquidos fijadores, hasta ahora de composición desconocida.

5.2.2. INMUNOENSAYOS

Para intentar superar los inconvenientes que lleva implícito el examen microscópico, en los últimos años se han desarrollado técnicas de diagnóstico inmunológico o inmunoensayos, basadas tanto en la detección de anticuerpos anti-*Giardia*, como de antígenos de *Giardia* en las muestras fecales (Gutiérrez-Cisneros y col., 2011; Nguyen y col., 2012; Jahan y col., 2014). Dado que la correlación existente entre los títulos de anticuerpos anti-*Giardia* positivos y la giardiosis activa es pobre, las pruebas diagnósticas se han dirigido hacia la detección directa de antígenos en las heces (Rosenblatt y col., 1993; Winiecka-Krusnell y col., 1995; Díaz-Carbonell y col., 1996; Hanson y col., 2001; Ahmed y col., 2013; Jahan y col., 2014).

Los principales inmunoensayos basados en la detección de antígenos de *Giardia* son: 1) Anticuerpo fluorescente directo (DFA) o inmunofluorescencia directa (IFD) 2) Inmunoensayo enzimático (IC) y 3) Inmunoensayos enzimáticos o enzimoimmunoanálisis (EIA) (Ahmed y col., 2013; Jahan y col., 2014).

El método de anticuerpos fluorescente directo (DFA) permite la visualización de todo el parásito a través de la fluorescencia emitida cuando el anticuerpo se une a su antígeno específico. Los Inmunoensayos enzimáticos (EIA) permiten un resultado objetivo cuando los resultados se obtienen midiendo densidades ópticas. Además, la inmunoensayo enzimático (IC) permite una fácil interpretación de los resultados mediante la visualización de una banda coloreada (Van den Bossche y col., 2015).

A día de hoy cabe destacar que estas técnicas de inmunoensayo se basan fundamentalmente en técnicas de enzimoimmunoanálisis (EIA), una herramienta diagnóstica potencialmente eficiente (Elkadi y col., 1992; Díaz-Carbonell y col., 1996; Schunk y col., 2001).

Los métodos de inmunoensayo ofrecen una elevada sensibilidad y especificidad, pudiendo detectar cargas parasitarias bajas (Janoff y col., 1989; Addiss y col., 1991; Elkadi y col., 1992; Aldeen y col., 1995; Hanson y col., 2001; Gaafar, 2011; Korzeniewski y col., 2016; Silva y col., 2016; Soares y col., 2016). De hecho, en aquellos lugares donde la giardiosis no se solapa con infecciones provocadas por otros parásitos intestinales, se ha sugerido el empleo rutinario del enzimoimmunoanálisis como método diagnóstico de laboratorio; otros expertos recomiendan justo lo contrario en esos entornos, abogando por el análisis microscópico de una sola muestra de heces (Hanson y col., 2001). Otros parásitos como son *Cryptosporidium*, *Blastocystis* o incluso *Entamoeba* o *Dientamoeba fragilis* presentan el mismo mecanismo de transmisión que *Giardia lamblia*, y probablemente esa sea la razón por la que muchos profesionales desaconsejan el abandono de la microscopía como técnica de diagnóstico.

Como inconveniente, tanto la IFD como el EIA tardan más de una hora en mostrar el resultado de la muestra examinada, y es por ello que estas herramientas diagnósticas se emplean de manera óptima en entornos en

los que es preciso analizar un gran número de muestras ya que permiten analizar las muestras por lotes (Van den Bossche y col., 2015). Para solventar este problema se han desarrollado unas pruebas de diagnóstico rápido (PDR), consistentes en pruebas inmunoabsorbentes de flujo lateral que permiten la detección de antígenos tanto de un solo tipo de protozoo como de varios en un formato de única prueba. Además, estas PDR ofrecen otras ventajas como son su desempeño fácil, su interpretación sencilla y su capacidad para agilizar el diagnóstico, y su empleo en entornos con escasos recursos, resultando a su vez económicas. Estas PDR inmunoabsorbentes han sido comparadas en diferentes estudios, y su sensibilidad oscila entre el 58% y el 97,2%, mientras que su especificidad se encuentra entre el 99% y el 100% (García-Bujalance y col., 2013; Van den Bossche y col., 2015).

5.2.2.1. ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS (ELISA)

El inmunoensayo enzimático o enzimunoanálisis, y más concretamente el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), es uno de los inmunoensayos de detección de antígenos más usados en el diagnóstico de la giardiosis (Elkadi y col., 1992; Díaz-Carbonell y col., 1996; Schunk y col., 2001).

Para ello se utilizan antígenos *Giardia lamblia* específicos y otros que no lo son (Rosenblatt y col., 1993). Los antígenos específicos se encuentran en la superficie del parásito, mientras que los antígenos comunes son los antígenos somáticos (Rosenblatt y col., 1993). El ELISA se basa en la detección de antígenos solubles en muestras de heces, en concreto en la detección de un antígeno específico de *Giardia*, la glicoproteína GSA-65, presente en quistes y trofozoítos (Vidal y col., 1996; Vidal y col., 2005; Jahan y col., 2014; Korzeniewski y col., 2016; Silva y col., 2016; Soares y col., 2016). La glicoproteína GSA-65 es el principal antígeno que se encuentra en las heces de los individuos con giardiosis (Vidal y col., 2005). Este antígeno se encuentra asociado a las paredes de los quistes y trofozoítos de *Giardia*, en grandes cantidades. Esto hace que se pueda encontrar en las heces de individuos infectados, incluso cuando el parásito viable no está presente, lo que proporcionaría un diagnóstico microscópico negativo sin que sea un falso negativo (Elkadi y col., 1992; Rosenblatt y col., 1993; Díaz-Carbonell y col., 1996; Vidal y col., 2005; Silva y col., 2016). Entre los estudios que apoyan esta metodología, Janoff y col., refieren en su estudio de 1989 que la identificación adicional de antígenos específicos de *Giardia lamblia* podría ser útil para estandarizar y mejorar la utilidad clínica de los métodos de diagnóstico y para definir la historia natural de la giardiosis (Janoff y col., 1989).

Los primeros ensayos inmunoenzimáticos realizados mostraron una sensibilidad del 92% y una especificidad del 98%, con el inconveniente de que se debían usar muestras de heces frescas (Vidal y col., 2005). En 1985, se llevó a cabo un estudio en Reino Unido en pacientes con giardiosis en el que se describió el empleo de ELISA utilizando antisueros purificados por afinidad contra antígenos de *Giardia*, obteniendo una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100% (Elkadi y col., 1992). En 1989, fue posible aplicar al diagnóstico inmunoenzimático antígenos específicos contra la pared de los quistes de *Giardia lamblia*, como es la glicoproteína GSA-65, lo cual aumentó la sensibilidad de un 96% a un 99% y la especificidad de un 96% a un 99% (Vidal y col., 2005). A día de hoy, los kits comerciales empleados para el diagnóstico inmunoenzimático permiten la utilización de muestras de heces preservadas, lo cual hace que el proceso diagnóstico sea más sencillo (Vidal y col., 2005). Poder emplear el método diagnóstico del ELISA con heces preservadas obteniendo un buen rendimiento proporciona la ventaja de poder usar el ELISA en estudios epidemiológicos donde grandes cantidades de muestras fecales almacenadas en formalina requieren ser analizadas (Goldin y col., 1991).

Vidal y col., en su estudio de 2005 describen la existencia de un método de ELISA para la detección de otros antígenos fecales, en el que los resultados podían ser evaluados de una manera colorimétrica, visual, obteniendo así una sensibilidad superior al 98% y una especificidad del 100%. Desde entonces, varios kits han sido desarrollados y la reciente comercialización de los mismos ha mostrado que son métodos rápidos y efectivos para el diagnóstico de la giardiosis en aquellos pacientes con sintomatología gastrointestinal (Aldeen y col., 1995; Vidal y col., 2005; Jahan y col., 2014; Hawash y col., 2016). Así pues, estos mismos autores exponen en su estudio unos valores de sensibilidad que oscilan entre el 94% y el 99% y unos valores de especificidad del 100% para los mencionados kits (Vidal y col., 2005).

Otra ventaja respecto al análisis microscópico es la posibilidad de poder ser realizados por técnicos de laboratorio obviando la necesidad de microscopistas o personal con experiencia y disminuyendo así la carga de trabajo (Gaafar, 2011; Jahan y col., 2014). Además, en la actualidad se usan lectores de placas para la lectura de los mismos, facilitando así también la interpretación de los resultados a los profesionales de laboratorio.

Por todo lo mencionado, el diagnóstico por ELISA puede ayudar en el diagnóstico precoz, así como permitir el tratamiento oportuno de niños infectados con *Giardia*, mejorando así su crecimiento y su desarrollo físico y previniendo de secuelas adversas en forma de giardiosis crónica (Addiss y col., 1991; Jahan y col., 2014). No obstante, existe el factor limitante del precio, ya que el uso de esta tecnología en el diagnóstico de la giardiosis presenta un precio más elevado en comparación con los métodos tradicionales del análisis microscópico (Vidal y col., 2005). Sin embargo, no todos los autores son afines a esta desventaja económica (Ungar y col., 1984; Janoff y col., 1989; Aldeen y col., 1995; Hanson y col., 2001). La instrumentalización del ELISA aumenta la sensibilidad y la especificidad, eliminando errores de operador; es por ello que se han desarrollado lectores para estos ensayos que facilitan el trabajo, pero aumentan el coste del análisis.

A pesar de todo, hay que tener presente que la microscopía es útil para diagnosticar/detectar otros parásitos intestinales, hecho por el cual el ELISA no puede ser un sustituto para el examen microscópico (Aldeen y col., 1995; Schunk y col., 2001; Vidal y col., 2005).

Múltiples estudios se han realizado intentando comparar las técnicas de inmunoensayo enzimático (EIA) / ELISA y la microscopía. En la Tabla 2 (Anexo II) se muestran los resultados de los principales estudios realizados al respecto.

Las principales características observadas en la comparación son (Anexo II. Tabla 2):

A) Sensibilidad y especificidad

Los enzimooinmunoanálisis (EIA), y en concreto el ELISA, pretenden aumentar la sensibilidad diagnóstica de giardiosis en una única muestra de heces en comparación con las 3 muestras que son requeridas para realizar el análisis microscópico. No obstante, la mayoría de los estudios no utilizan la observación al microscopio de las 3 muestras de heces como análisis de referencia, sino que comparan con el análisis de una sola muestra o a lo sumo, con 2 muestras. Los únicos estudios que realmente comparan con el estándar de referencia fueron los llevados a cabo por Jahan y col., en 2014 y por Korzeniewski y col., en 2016. En el primero se compararon los resultados obtenidos con en análisis microscópico de 3 muestras fecales por paciente frente a los obtenidos por RIDASCREEN® (ELISA) en una sola muestra por paciente; en el segundo, se compararon los resultados obtenidos por el análisis microscópico en 3 muestras fecales por paciente, con los obtenidos por RIDA®QUICK (IC) y por RIDASCREEN® (ELISA) en una sola muestra fecal por paciente (Jahan y col., 2014; Korzeniewski y col., 2016).

Las sensibilidades obtenidas en los diferentes estudios analizados en la presente revisión se muestran en la Tabla 2 (Anexo II). En general, las sensibilidades obtenidas para los EIA son elevadas, con una sensibilidad media en los estudios analizados del 94%, siendo la sensibilidad más baja encontrada del 80% (Mank y col., 1997) y la más elevada del 100% (Dutt y col., 1991; Mank y col., 1997 Schunk y col., 2001; Gaafar 2011, Jahan y col., 2014 y Korzeniewski y col., 2016).

Mank y col., en su estudio de 1997, compararon los resultados de analizar: 1) una muestra para el análisis microscópico y una muestra para los 2 kits de ELISA (ProspecT/*Giardia* y Celisa), 2) 2 muestras para el análisis microscópico y una muestra para los 2 kits de ELISA y 3) 2 muestras para el análisis microscópico y 2 muestras para los 2 kits de ELISA. El caso que más se acercó al estándar de referencia, fue 2 muestras para el análisis microscópico y una muestra para los 2 kits de ELISA, con una sensibilidad del 96,4% para la microscopía y del 92,7% y el 87,3% para los 2 kits de ELISA (ProspecT/*Giardia* ELISA y Celisa, respectivamente), lo cual no apoya el hecho de que el ELISA aumente la sensibilidad diagnóstica empleando menos muestras que el análisis microscópico (Mank y col., 1997).

Otro estudio en el que merece la pena detenerse es en el de Hanson y col., del año 2001; en el que también se compararon los resultados obtenidos del análisis microscópico y de los EIA tanto con una muestra como

con 2 muestras. La situación que más se acercó al estándar de referencia fue 2 muestras para el análisis microscópico y una sola muestra para el EIA, con sensibilidades similares a las descritas en el estudio de Mank y col., de 1997, ya que se objetivó una sensibilidad para la microscopía del 93,3%, mientras que la del EIA descendió al 80%, no pudiendo tampoco apoyar así la teoría de una mayor sensibilidad de los EIA con menos muestras (Hanson y col., 2001).

No obstante, si se compara la detección en una sola muestra entre la microscopía y los EIA, estos últimos proporcionan una sensibilidad mayor en todos los estudios analizados, a excepción de 2 estudios: uno de ellos fue el estudio llevado a cabo por Goldin y col., en el 1991, en el que al analizar 161 muestras fecales de 161 niños chilenos, la sensibilidad del análisis microscópico con las muestras en suspensión salina tamponada con fosfato y la sensibilidad de ELISA fue del 95% para ambas pruebas, mientras que si se analizan esas mismas 161 muestras fecales por microscopía con las muestras conservadas en formalina y por ELISA, la sensibilidad fue de nuevo del 95% para la microscopía y del 94% para el caso de ELISA, no obteniendo por lo tanto en ninguno de los dos supuestos sensibilidades mayores por parte de ELISA (Goldin y col., 1991). El otro estudio fue el llevado a cabo en el 1993 por Rosenblatt y col., en el que pese a haber mostrado una sensibilidad del 97% para ELISA, estos autores no pudieron afirmar que la sensibilidad fuera mayor que la aportada por el análisis microscópico (Rosenblatt y col., 1993). La mayor sensibilidad en la detección de giardiosis por parte del ELISA en comparación con la microscopía en una sola muestra de heces se debe a que este inmunoensayo es capaz de detectar pequeñas cantidades de antígenos en las muestras en las que hay escasos quistes y trofozoítos (Ungar y col., 1984; Rosenblatt y col., 1993; Vidal y col., 2005). Este hecho se ve reflejado en los estudios de Vidal y col., del 2005 y de Hanson y col., del 2001. A su vez, se ha mostrado como el EIA poseía una mayor capacidad de detección en comparación con la microscopía en las muestras de pacientes asintomáticos donde la carga parasitaria también era baja (sensibilidad del 61,1% por parte de la microscopía y del 77,8% por parte del EIA) (Hanson y col., 2001). Por ello se piensa que el ELISA podría ser útil en la detección de giardiosis en personas que no excretan activamente quistes de *Giardia* en las heces y en portadores asintomáticos, especialmente en entornos donde la infección por *Giardia* es endémica (Ungar y col., 1984). No obstante, cabe decir que también se ha demostrado el fracaso por parte del ELISA para identificar *Giardia lamblia* en 3 muestras con un bajo número de parásitos, sugiriendo así que esas 3 muestras examinadas no contenían el suficiente antígeno como para poder ser detectados por parte del ELISA o que algunas cepas de *Giardia* contenían algunos antígenos diferentes de los inmunógenos (Ungar y col., 1984). Esta capacidad del EIA de poder detectar cantidades pequeñas de antígeno en las muestras de heces implica que muestras resultantes negativas por microscopía, serían positivas al analizarlas por ELISA (Dutt y col., 1991; Aldeen y col., 1995; Vidal y col., 2005). Reflejo de ello es el estudio de 1997 de Mank y col., en el que hubo casos de giardiosis únicamente diagnosticados mediante el EIA, en los que el primer análisis microscópico resultó ser negativo, pero tras repetirlo resultó ser también positivo (Mank y col., 1997).

Destacable es el estudio llevado a cabo en el 2016 por Korzeniewski y col., en el que se obtuvo una sensibilidad marcadamente baja por parte de la microscopía (14.9%) en comparación con la sensibilidad del 100% reportada por ELISA (Anexo II. Tabla 2). Los autores de este estudio comentan que el análisis microscópico de las muestras fecales se hizo tras 2-4 semanas de haber recibido las muestras y haberlas fijado en formalina al 10%, con lo que es posible que se subestimara la verdadera prevalencia de *Giardia lamblia* en dichas muestras (Korzeniewski y col., 2016). Además, las 114 muestras con resultado positivo por parte de ELISA se consideraron como verdaderos positivos pese a que sólo 17 fueron positivas por análisis microscópico y sólo 6 por inmunoensayo, de ahí la gran diferencia entre las sensibilidades obtenidas comentadas anteriormente.

Es por esa capacidad del ELISA de poder detectar antigenicidad de *Giardia*, aun en ausencia de excreción de los quistes y trofozoítos, lo que solventaría el problema de la sensibilidad dependiente del diagnóstico microscópico debido a la intermitencia de excreción de quistes y trofozoítos en las heces (Ungar y col., 1984).

Respecto a la especificidad, y como se puede apreciar en la Tabla 2 (Anexo II), esta es elevada, ya que la especificidad media de los estudios analizados en la presente revisión es del 95,73%, siendo la especificidad más baja la encontrada la del estudio de 1991 de Goldin y col., correspondiente a un 82% y la más elevada encontrada la del estudio del 2016 de Korzeniewski y col., siendo esta del 100%. Sin embargo, en todos los

casos en los que se dispone de la especificidad de la microscopía, esta es más elevada, a excepción del estudio del 2016 de Korzeniewski y col., en el que la especificidad de ambas técnicas diagnósticas fue la misma.

Que en casi todos los estudios la especificidad de los EIA sea menor que la aportada por la microscopía, se puede explicar porque al poseer los EIA una mayor sensibilidad que la microscopía, al poder detectar antígenos aún en ausencia de excreción en las muestras fecales de quistes y trofozoítos, hace que la especificidad de los EIA sea más baja en comparación con la microscopía cuando esta es usada como el estándar de referencia (Schunk y col., 2001).

Por lo tanto, debido a la alta sensibilidad y especificidad que ofrece el diagnóstico de giardiosis mediante ELISA, Silva y col., proponen que este abordaje diagnóstico sería muy útil en hospitales pediátricos y laboratorios de referencia, especialmente en niños con enfermedad diarreica y en casos donde existe una fuerte sospecha de giardiosis y los pacientes presentan resultados no concluyentes o resultados microscópicos negativos (Silva y col., 2016). En el estudio de Dutt y col., estos también recomiendan el empleo rutinario del ELISA, especialmente en los casos clínicamente sospechosos de infección por *Giardia lamblia* (Dutt y col., 1991). La misma cuestión es apoyada también por Aldeen y col., los cuales abogan por usar ProSpecT/*Giardia* ELISA para el diagnóstico de rutina de la giardiosis en personas que presenten sintomatología gastrointestinal sospechosa de la misma (Aldeen y col., 1993). A su vez, Rosenblatt y col., proponen que, como ELISA parece ser, al menos, tan sensible como el análisis microscópico a la hora de detectar giardiosis en una sola muestra de heces, sería razonable suponer que ELISA sería tan eficiente como lo es la microscopía para diagnosticar la giardiosis en pacientes individuales (Rosenblatt y col., 1993).

Por otro lado, los kits de EIA como son ProSpecT/*Giardia* o RIDASCREEN®, han mostrado ser altamente sensibles y específicos para el diagnóstico de la giardiosis, pudiendo considerarse técnicas alternativas al análisis microscópico (Rosoff y col., 1989; Addiss y col., 1991; Hanson y col., 2001; Schunk y col., 2001).

Por todo lo mencionado, se cree que efectivamente, los análisis inmunoenzimáticos son herramientas diagnósticas que presentan una sensibilidad y especificidad elevadas. Sin embargo, se vuelve a recalcar que la mayoría de los estudios analizados no compararon con el estándar de referencia del análisis microscópico de 3 muestras de heces, sino con el análisis microscópico de una sola muestra de heces o, a lo sumo, 2 muestras de heces, creyendo por lo tanto necesario la publicación de estudios que comparen los resultados diagnósticos de los EIA con una sola muestra de heces con los resultados diagnósticos del análisis microscópico con 3 muestras de heces.

B) Falsos positivos

La obtención de resultados falsos positivos por parte del ELISA ha sido documentada en varios estudios (Janoff y col., 1989; Goldin y col., 1991; Rosenblatt y col., 1993; Aldeen y col., 1995; Hanson y col., 2001; Schunk y col., 2001; Gaafar 2011; Silva y col., 2016).

Janoff y col., en el 1989, detectaron una mayor tasa de falsos positivos entre los niños pequeños que acudían a centros de cuidado infantil, en los cuales la tasa de parasitación por *Giardia lamblia* es alta, en comparación con los adultos, por lo que estos autores llegaron a la conclusión de que la tasa del 24% de falsos positivos encontrada por parte del ELISA en esos niños que acudían a centros de cuidado infantil podría ser explicada por una mayor sensibilidad de detección de giardiosis por el ELISA en comparación con el diagnóstico microscópico (Janoff y col., 1984). A esta misma conclusión llegaron también Addiss y col., ya que su estudio de 1991 también se llevó a cabo en el contexto epidemiológico de los centros de cuidado infantil (Addiss y col., 1991).

En el caso del estudio de 1997 de Mank y col., se obtuvieron un total de 7 casos falsos positivos; sin embargo, esos 7 casos volvieron a ser analizados por el examen microscópico y se informó de que 5 de esos 7 casos, que previamente arrojaron un resultado negativo por parte de la microscopía, resultaron ser positivos para giardiosis; los otros 2 casos restantes también se consideraron como positivos pese a tener un examen microscópico negativo, ya que se consideró que tanto el antecedente epidemiológico como la sintomatología acompañante eran suficientes como para clasificar a esos 2 casos como positivos para giardiosis (Mank y col., 1997). Por lo tanto, esos 7 casos clasificados de primeras como falsos positivos por parte del ELISA resultaron ser al final 7 casos verdaderos positivos, reflejando ahí una vez más la eficacia del ELISA en el diagnóstico de

la giardiosis (Mank y col., 1997). Otros estudios también han reportado resultados similares (Goldin y col., 1991).

Las explicaciones y las formas de resolver esos falsos positivos, han sido variadas. Por ejemplo, en el estudio de 1991 de Goldin y col., los autores no pudieron descartar por completo que los resultados falsos positivos brindados por ELISA fuesen el resultado del almacenamiento de esas muestras en formalina, lo cual dijeron que podría deberse a la producción de antígenos de reactividad cruzada en muestras fecales que no contenían antígenos de *Giardia* previamente a su almacenamiento en formalina (Goldin y col., 1991). Rosenblatt y col., en el 1993, también encontraron 7 casos falsos positivos, pero consideraron 5 de esos casos como verdaderos positivos pensando, que la congelación y descongelación de las muestras de heces pudo haber producido la liberación de antígenos que sí fueron detectados por ELISA y no por el análisis microscópico; los 2 casos restantes se atribuyeron también como verdaderos positivos de giardiosis debido a que encajaban con el contexto epidemiológico y la sintomatología presentada (Rosenblatt y col., 1993). En el caso del estudio de Aldeen y col., de 1995, en el que también se mostraron otros 7 falsos positivos, los autores los consideraron como tal por fallos atribuidos al ELISA (Aldeen y col., 1995). Algo parecido sucedió en el estudio de 2001 de Hanson y col., en el que los 2 casos falsos positivos presentes en su estudio se consideraron como tal también por fallos debidos al propio ELISA (Hanson y col., 2001). Schunk y col., en su estudio de 2001, revelaron un único falso positivo, coincidiendo con la opinión de Aldeen y col., y Hanson y col. (Schunk y col., 2001) y lo mismo sucedió con los 4 casos falsos positivos detectados por Gaafar en su estudio de 2011 (Gaafar, 2011). Otro caso un poco diferente es el ocurrido en el estudio de 2016 de Silva y col., en el que en el subgrupo de 493 muestras fecales correspondientes a niños que acudían a centros de cuidados infantiles se objetivaron 20 resultados positivo por el ELISA, pero negativos por parte de la microscopía, atribuyéndole por lo tanto 20 casos falsos positivos al ELISA; no obstante, esos 20 casos fueron analizados posteriormente por medio de la PCR, mostrándose amplificación del ADN compatible con la presencia de *Giardia lamblia* en 11 de los casos (55% de los casos), confirmando por lo tanto la ocurrencia de que muestras con resultado verdaderamente positivo por ELISA pueden ser negativas por parte de la microscopía (Silva y col., 2016). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los 9 casos restantes no confirmados por la PCR (el 45% restante de los casos) plantea la posibilidad de que esos 9 casos realmente fueran 9 falsos positivos arrojados por el ELISA (Silva y col., 2016). A su vez, en ese mismo estudio, teniendo en cuenta las 824 muestras totales de niños analizadas (incluido ahí el subgrupo de los niños que acudían a centros de cuidado infantil), hubo 68 que sólo resultaron positivas mediante ELISA y los autores refirieron que era poco probable que ese alto número de casos detectados únicamente por el ELISA fueran el resultado de una reacción cruzada porque la mayoría de los niños no mostraron coinfección con otros tipos de parásitos (Silva y col., 2016).

De esta forma, se puede observar como el diagnóstico mediante la técnica ELISA es efectivo y a veces incluso presenta un mejor rendimiento que el diagnóstico microscópico, pero no hay que pasar por alto que también presenta fallos en el diagnóstico como han mostrado los estudios mencionados. En estos casos, es importante que el médico clínico considere ese antecedente epidemiológico y la presencia de síntomas para decidir si se puede considerar un verdadero positivo y si es necesaria la prescripción del tratamiento oportuno.

C) Falsos negativos

Aunque este hecho no ha sido muy común en los estudios analizados en la presente revisión, sí que algunos autores han comentado su presencia.

En el estudio de 1984 de Ungar y col., hubo 2 casos falsos negativos por parte del ELISA en los que los 2 casos sí fueron detectados por la microscopía, y los autores atribuyeron dichos resultados falsos negativos a un fracaso del ELISA debido a la cantidad insuficiente de antígeno en las muestras que no pudo ser detectada (Ungar y col., 1984). En el estudio de Janoff y col. de 1989 hubo también 2 casos falsos negativos por parte del ELISA en los que los 2 casos sí fueron detectados mediante la microscopía, mostrando así los posibles errores en la detección por parte del ELISA (Janoff y col., 1989). En el estudio de Mank y col. de 1991 el ELISA arrojó 4 resultados falsos negativos que sólo fueron detectados por parte del análisis microscópico, reflejando también así la no infalibilidad del diagnóstico mediante el ELISA (Mank y col., 1997). Por último, en el estudio de 2016 de Silva y col., hubo 3 muestras detectadas por el análisis microscópico que no lo fueron por el ELISA, resultando así en 3 resultados falsos negativos por parte del ELISA, demostrando así que el diagnóstico

mediante el ELISA también produce fallos (Silva y col., 2016). Algunos informes han correlacionado este fallo en la detección por parte del ELISA con cambios moleculares en el antígeno, como son la degradación, la falta de accesibilidad al sitio del anticuerpo para la reacción o la homogeneización insuficiente de la muestra, lo que resulta en la ausencia del antígeno en la porción analizada (Silva y col., 2016).

D) Necesidad de menos muestras

Como se ha comentado anteriormente, los EIA parecen mostrar una mayor sensibilidad diagnóstica cuando se analiza una sola muestra de heces en comparación con el análisis microscópico (Ungar y col., 1984; Janoff y col., 1989; Elkadi y col., 1992; Dutt y col., 1991; Aldeen y col., 1995; Hanson y col., 2001; Schunk y col., 2001; Vidal y col., 2005; Gaafar 2011; Silva y col., 2016). Es por ello que en un gran número de estudios se muestra la ventaja del ELISA respecto a la microscopía de no requerir más de una muestra para lograr un diagnóstico sensible; sin embargo, a excepción de los estudios de Mank y col., del 1997 y de Korzeniewski y col., del 2016, en los estudios no se han comparado realmente los resultados obtenidos por una sola muestra de heces por parte de los EIA y los resultados obtenidos por 3 muestras de heces por parte de la microscopía, siendo por tanto esa disminución en la cantidad de muestras requeridas facticia (Ungar y col., 1984; Díaz-Carbonell y col., 1996; Mank y col., 1997; Vidal y col., 2005; Korzeniewski y col., 2016 y Silva y col., 2016).

A su vez, en el estudio de 1997 de Mank y col., en el que se compararon los resultados obtenidos de una sola muestra de heces por parte del EIA y los obtenidos en 2 muestras por parte de la microscopía, se observó como la sensibilidad diagnóstica no era mayor en los EIA, no apoyando por lo tanto la ventaja de necesitar menos muestras que el análisis microscópico. Es más, en situaciones en las que el riesgo de giardiosis es alto y la prevalencia de infección con otros parásitos es también alta, se sugiere la necesidad de 2 muestras de heces en vez de una para realizar el diagnóstico mediante los EIA, por lo que no representan una ventaja real en lo que a número de muestras se refiere, respecto a la microscopía (Hanson y col., 2001). También se ha demostrado que aumentando el número de muestras analizadas, con diferencias en la sensibilidad que pasa del 87,3%-92,7% al 98,2%-100% cuando se utiliza una muestra o dos de ellas respectivamente, la sensibilidad del ELISA mejora. Esto es lógico, el problema es que de esta forma el ELISA no aporta ventajas frente a la microscopía (Mank y col., 1997; Jahan y col., 2014).

Cuando se han comparado los resultados obtenidos en 3 muestras por el análisis microscópico y los obtenidos en una sola muestra por ELISA sí que se reflejó la superioridad del ELISA en una sola muestra de heces (Korzeniewski y col., 2016). No obstante, como ya se ha comentado anteriormente, parece que las condiciones en que estos ensayos se realizaron pudieron influir marcadamente en el resultado obtenido.

E) Ahorro de tiempo

Es bien sabido que el análisis de las muestras por parte de la microscopía es un procedimiento que conlleva al examinador de unos 20-30 minutos por muestra para poder dar un resultado fiable (concentración, tinción y visualización) (Ungar y col., 1984; Addiss y col., 1991; Aldeen y col., 1993; Verweij y col., 2003; ten Hove y col., 2007; ten Hove y col., 2009; Gaafar, 2011; Jahan y col., 2014; Sadaka y col., 2015; Van den Bossche y col., 2015; Laude y col., 2016; Silva y col., 2016; Soares y col., 2016).

Por el contrario, algunas técnicas diagnósticas del EIA permiten el diagnóstico de varias muestras a la vez, en lote, pudiendo obtener en tan solo 15 min los resultados de varias muestras (Gaafar 2011). Este es el motivo por el que se prefiere la aplicación de los EIA frente al análisis microscópico en aquellos estudios en los que varias muestras requieran ser analizadas, como ocurre en los estudios epidemiológicos, o en las situaciones en las que se requiera a su vez un resultado en el menor tiempo posible, como es el caso de los brotes, ya que permiten un ahorro de tiempo en establecer el diagnóstico de las muestras (Ungar y col., 1984; Janoff y col., 1989; Goldin y col., 1991; Addiss y col., 1991; Elkadi y col., 1992; Rosenblatt y col., 1993; Aldeen y col., 1995; Vidal y col., 2005; Jahan y col., 2014; Korzeniewski y col., 2016; Silva y col., 2016).

F) Precio

Vidal y col., exponían en su estudio de 2004 que unos de los factores limitantes de ELISA era su precio elevado en comparación con el método tradicional de la microscopía, ya que en su estudio estimaron un precio por muestra examinada de 6,7\$ en el caso de ELISA frente a 0,02-0,10\$ en el caso de la microscopía (Vidal y

col., 2005). Sin embargo, este hecho es contrario al encontrado en otros estudios. Ungar y col., exponen en su estudio de 1984 un ahorro económico en su estudio al emplear ELISA en comparación con el empleo del análisis microscópico, coincidiendo esta observación con otros estudios (Ungar y col., 1984; Janoff y col., 1989; Aldeen y col., 1995; Hanson y col., 2001). Los autores Rosenblatt y col. comparten también en su estudio de 1993 la opinión del ahorro monetario, pero estos autores aluden al ahorro de dinero sólo en los casos en los que se sospeche infección *Giardia lamblia* y no por otro parásito intestinal, ya que según sus cálculos, el costo de realizar ELISA debería ser menos de la mitad del costo de un examen microscópico completo de parásitos en las heces, incluyendo el procedimiento de concentración y posterior preparación de un portaobjetos con tinción. A su vez, Rosenblatt y col., exponen que el equipo del ELISA necesario para llevar a cabo el análisis de las muestras no es un equipo costoso económicamente hablando (Rosenblatt y col., 1993).

Otro ejemplo de ahorro del precio reflejado con cifras numéricas es el expuesto en el estudio de 1995 de Aldeen y col., en el que se afirmaba que ProspecT/*Giardia* ELISA era más barata que la microscopía: si se tenía en cuenta tanto los gastos derivados de los materiales necesarios como los derivados del trabajo por parte del personal, los materiales de la microscopía por muestra eran 3\$, ascendiendo a 6,25\$ en el caso de ProspecT/*Giardia* ELISA, mientras que el precio del trabajo por el personal era de 8\$ por muestra para la microscopía y descendía a 2,70\$ para ProspecT/*Giardia* ELISA; todo esto hizo que el cómputo total del gasto para la microscopía fuese de 11\$ por muestra y de 8,95\$ para ProspecT/*Giardia* ELISA, reflejando así el ahorro por parte de ProspecT/*Giardia* ELISA en comparación con el análisis tradicional de las muestras por microscopía (Aldeen y col., 1995).

G) Personal y carga de trabajo

Como ya se ha comentado en varias ocasiones, la técnica diagnóstica del análisis microscópico es una técnica laboriosa que a su vez requiere personal capacitado y entrenado para llevarla a cabo (Ungar y col., 1984; Addiss y col., 1991; Verweij y col., 2003; ten Hove y col., 2007; ten Hove y col., 2009; Gaafar, 2011; Jahan y col., 2014; Sadaka y col., 2015; Van den Bossche y col., 2015; Laude y col., 2016; Silva y col., 2016; Soares y col., 2016). Diversos autores coinciden en la opinión de que los EIA son técnicas sencillas de realizar, que no requieren de parasitólogos con experiencia ni de personal entrenado en exceso, sino que con un entrenamiento mínimo y simple por parte del personal es suficiente para poder desempeñarlos; además, a día de hoy, la lectura de las placas se encuentra automatizada (Ungar y col., 1984; Janoff y col., 1989; Rosenblatt y col., 1993; Hanson y col., 2001; Gaafar, 2011; Silva y col., 2016). El cómputo de estas virtudes produce la ventaja de disminuir la carga del trabajo al personal que lleva a cabo la técnica, produciendo a su vez un ahorro de tiempo y un ahorro económico (Ungar y col., 1984; Janoff y col., 1989; Rosenblatt y col., 1993; Hanson y col., 2001; Gaafar, 2011; Silva y col., 2016).

H) Flexibilidad en el manejo de las muestras

Las muestras fecales para llevar a cabo el diagnóstico de giardiosis por los EIA son fáciles de preparar y se pueden recolectar y almacenar en una gran variedad de condiciones (Ungar y col., 1984). Así pues, en el estudio de Gaafar, la herramienta diagnóstica de Triage EIA (kit del EIA) se realizó con muestras de heces frescas, congeladas y sin fijar, no apreciándose una disminución en el rendimiento de la misma (Gaafar, 2011).

Unas de las características que poseen las muestras fecales infectadas por giardiosis es la duración relativamente larga de su antigenicidad y la reproducibilidad de los resultados, lo cual proporciona al ELISA la ventaja de no tener que realizar un examen inmediato de las muestras nada más recibirlas (Ungar y col., 1984). Estas características, a su vez, le ofrecen al ELISA una amplia aplicabilidad en el campo diagnóstico, en investigaciones epidemiológicas y en laboratorios de referencia (Ungar y col., 1984). Como durante las encuestas epidemiológicas las muestras de heces se suelen recolectar y transportar en formalina, en un estudio llevado a cabo en 1991 por Goldin y col., se concluyó que el tratamiento y el almacenamiento de las muestras fecales con formalina no afectaba significativamente/negativamente al rendimiento de ELISA en su detección de antígenos, mostrándose así la ventaja de que el uso de ELISA facilita la aplicación en encuestas epidemiológicas donde se acumulan grandes cantidades de muestras fecales almacenadas en formalina para ser analizadas (Goldin y col., 1991; Rosenblatt y col., 1993). Por el contrario, Ungar y col., en su estudio de 1984, expusieron que cuando las muestras se almacenaban en formalina o en alcohol polivinílico, los

resultados del ELISA no fueron reproducibles, es decir, cuando se repitió la misma prueba no fueron consistentes; a su vez, estos mismos autores mostraron que los resultados del ELISA en heces preservadas en formalina y en alcohol polivinílico no se correlacionaban con los exámenes microscópicos de las muestras frescas y congeladas. Es por ello que Ungar y col., establecen que la conservación de las muestras en formalina y en alcohol polivinílico supone una limitación para el análisis por ELISA (Ungar y col., 1984).

Otra posibilidad para la conservación de las muestras es la congelación de las mismas, ya que se ha demostrado que el rendimiento de ELISA no se ve afectado por períodos de congelación de las muestras de hasta 18 meses y que la congelación y descongelación repetida de muestras hasta 15 veces no parece afectar a los resultados del ELISA (Ungar y col., 1984; Rosenblatt y col., 1993). Es por ello que Rosenblatt y col., en su estudio de 1993, plantearon la idea de que la congelación y la descongelación de las muestras fecales posiblemente produjera la liberación de antígenos de *Giardia lamblia*, procedentes de organismos presentes en las muestras, en pequeñas cantidades no apreciadas por el análisis microscópico pero sí por el ELISA, produciendo así un aumento de la sensibilidad diagnóstica y planteando de esta manera que algunos falsos positivos detectados por ELISA fuesen realmente verdaderos positivos no detectados por la microscopía (Rosenblatt y col., 1993).

Otra ventaja que presenta el ELISA en cuanto al estado de las muestras es su capacidad para poder detectar como positivas a aquellas muestras diluidas en las que los organismos no podían visualizarse directamente a través de la microscopía, lo que sugiere que el ELISA puede detectar antígenos de organismos en descomposición e incluso productos secretores-excretores (Ungar y col., 1984).

I) Monitorizar la respuesta del tratamiento

El ELISA resulta también útil para el control y verificación del tratamiento frente a la giardiosis, ya que se ha demostrado la desaparición del antígeno específico de *Giardia lamblia* (GSLA) tras la terapia anti-parasitaria (Ungar y col., 1984; Dutt y col., 1991).

J) Detección de otros parásitos

Una de las grandes ventajas que oferta el análisis microscópico de las heces en comparación con los EIA es su capacidad para poder detectar simultáneamente más de un tipo de parásito en una misma muestra de heces (Ungar y col., 1984; Janoff y col., 1989; Rosenblatt y col., 1993; Aldeen y col., 1995; Mank y col., 1997; Schunk y col., 2001; Vidal y col., 20015; Gaafar, 2011; Elsafi y col., 2013; Korzeniewski y col., 2016; Silva y col., 2016; Soares y col., 2016).

De todos los estudios analizados en la presente revisión, ninguno de ellos contradice lo expuesto. Es por ello que autores como Schunk y col., exponen que pese a que RIDASCREEN® presente un incremento en la efectividad diagnóstica de la giardiosis, no puede reemplazar al análisis microscópico, ya que si no otros parásitos se podrían escapar del diagnóstico o no ser posible su detección mediante el método del ELISA (Schunk y col., 2001). Esto también es motivo de que varios autores hablen de no sustituir el diagnóstico microscópico por los EIA, sino combinar ambos métodos debido a la capacidad y gran ventaja de la microscopía de poder detectar otros parásitos (Janoff y col., 1989; Rosenblatt y col., 1993; Mank y col., 1997).

Inmunoglobulinas en suero para la detección de giardiosis

Tanto la respuesta inmunitaria humoral como la inmunitaria celular son importantes para eliminar a *Giardia lamblia* y para proporcionar inmunidad al huésped (Baqai y col., 1995; Díaz-Carbonell y col., 1996). Pese a que en el suero de los pacientes con giardiosis se han detectado anticuerpos IgG e IgM, son los anticuerpos secretores, y en especial la IgA, los principales anticuerpos encargados de llevar a cabo la respuesta inmune, debido a la localización intestinal del parásito, siendo necesaria a su vez la participación de los linfocitos T colaboradores (Díaz-Carbonell y col., 1996). El mecanismo de acción por el que dichos anticuerpos intentan prevenir o erradicar la infección por *Giardia lamblia* consiste en unirse a dicho parásito para reducir su motilidad e impedir su adhesión al enterocito (Díaz-Carbonell y col., 1996). A su vez, los macrófagos también intervienen en el desarrollo de una respuesta inmune efectiva, ya que presentan antígenos específicos de *Giardia lamblia* a los linfocitos T en las placas de Peyer (Díaz-Carbonell y col., 1996).

La detección de una manera temprana anticuerpos séricos específicos frente a *Giardia lamblia* podría proporcionar una forma de diagnóstico para la giardiosis (Chaudhuri y col., 1991; Baqai y col., 1995). La presencia de anticuerpos anti-giardia IgG indica que la infección ha estado presente algunas veces, pero no puede distinguir la infección actual de la ya pasada (Dutt y col., 1991; Baqai y col., 1995). Los anticuerpos anti-giardia IgA parecen ser un indicador de infección presente, pero su ausencia no excluye infección porque hasta dos tercios de los no produce una respuesta IgA sérica medible (Dutt y col., 1991). Un menor número de pacientes positivos para IgA indica que el papel protector de IgA contra el daño de la mucosa está disminuido en la giardiosis (Baqai y col., 1995). El anticuerpo sérico IgM está presente en la infección activa y por ello es útil para distinguir la giardiosis aguda frente a giardiosis previas, ya que la IgM sólo permanece en el suero del paciente infectado desde unos días hasta como mucho un mes; no obstante, este método diagnóstico requiere de una evaluación adicional (Dutt y col., 1991; Chaudhuri y col., 1991; Baqai y col., 1995; Behr y col., 1997). Que la giardiosis provoque una respuesta inmunitaria sistémica queda respaldada precisamente por esta presencia de IgM específicas frente a *Giardia lamblia* (Chaudhuri y col., 1991).

Por lo tanto, para un diagnóstico rápido y confiable de la giardiosis activa, se puede usar la detección de IgM mediante el EIA que detecte anticuerpos IgM específicos frente a *Giardia lamblia* (Chaudhuri y col., 1991; Baqai y col., 1995). En contraposición, otros autores piensan que debido a la baja sensibilidad que posee el diagnóstico de la giardiosis mediante la detección de inmunoglobulinas, estas únicamente son útiles para estudios con fines epidemiológicos (Díaz-Carbonell y col., 2016).

5.2.2.2. INMUNOCROMATOGRAFÍA (IC)

La inmunocromatografía consiste en un test rápido que se realiza en cuestión de 5-10 minutos. Se trata de una lámina en la que se han fijado anticuerpos monoclonales específicos para el parásito, obtenidos en la actualidad por técnicas de Ingeniería genética. La muestra se lisa en un tampón de lisis que el proveedor adjunta con las tiras, en pocos minutos. Cuando la tira se introduce en el lisado de la muestra, esta asciende por capilaridad, dejando ver una banda coloreada en caso de que la muestra contenga el antígeno buscado. Esto la convierte en una técnica rápida, sencilla de llevar a cabo y relativamente fácil de interpretar.

Con el interés continuo de las pruebas de diagnóstico rápido (PDR), los posibles brotes transmitidos por el agua, que cada vez hay menos microscopistas bien capacitados y la creciente evidencia de que *Giardia lamblia* puede causar síntomas graves en humanos, los laboratorios han reevaluado sus opciones diagnósticas con respecto a los kits de inmunoensayos que pueden incorporarse a sus protocolos diagnósticos de rutina (García y col., 2003).

Los ensayos inmunocromatográficos para la detección de antígenos de *Giardia lamblia* son métodos diagnósticos rápidos y fáciles de llevar a cabo, que a diferencia del ELISA, no requieren múltiples adiciones de reactivos, ni tampoco pasos de lavado ni incubaciones; además, estos métodos de diagnóstico constituyen una alternativa interesante al diagnóstico por ELISA y por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ya que eliminan las principales desventajas de estos dos métodos: sus costes elevados y la necesidad de un equipo adicional, (esto es, un lector de ELISA o una máquina en el caso de la PCR). Para la IC, la lectura visual es suficiente para el diagnóstico, no requiriendo así ningún equipo adicional (Gutiérrez-Cisneros y col., 2011; García-Bujalance y col., 2013; Banisch y col., 2015; Sadaka y col., 2015). A su vez, y al contrario que el análisis microscópico el cual consume mucho tiempo y necesita de personas expertas en microscopía, los ensayos inmunocromatográficos no requieren ni personal con experiencia ni equipos especiales para su desempeño, pudiendo ser pruebas de elección en aquellas situaciones en las que no se disponga de personal debidamente capacitado en microscopía (Gutiérrez-Cisneros y col., 2011; Elsafi y col., 2013; Van den Bossche y col., 2015). No obstante, pese a que las características de rendimiento de las pruebas de diagnóstico rápido (PDR) están ampliamente descritas en la literatura, estas son difíciles de comparar debido a la variabilidad en la metodología del estudio, la población investigada y el estándar de referencia empleado (Van den Bossche y col., 2015).

Estos métodos diagnósticos presentan una buena sensibilidad y especificidad, pudiendo establecerse como métodos de diagnóstico rápido de giardiosis en los casos en que muchas pruebas deban ser analizadas en poco tiempo, siendo ejemplo de ello los casos de brotes, y en entornos remotos donde es frecuente que otras

técnicas diagnósticas no estén disponibles (García y col., 2003; Schuurman y col., 2007; Gutiérrez-Cisneros y col., 2011; Van den Bossche y col., 2015). También es por su sensibilidad y rapidez que se ha propuesto su empleo en el cribado de la gastroenteritis aguda (GEA) en niños, especialmente en aquellos lugares que presentan dificultades para incorporar la PCR como método diagnóstico de la GEA (García-Bujalance y col., 2013). Igualmente, se ha propuesto su uso frente al de la microscopía en aquellas áreas y situaciones donde la prevalencia de giardiosis es alta y/o los recursos son escasos, siempre y cuando la prevalencia de otros parásitos entéricos sea baja y estas PDR posean características adecuadas de rendimiento (Van den Bossche y col., 2015). Pero, a pesar de que estos inmunoensayos rápidos son muy útiles para diagnosticar *Giardia lamblia*, el diagnóstico por microscopía y por PCR muestran una mayor fiabilidad diagnóstica, por lo que estos ensayos inmunocromatográficos se deben emplear en casos de resultados dudosos como técnicas diagnósticas confirmatorias así como técnicas complementarias al diagnóstico estándar en parasitología en el contexto de los estudios de campo (García y col., 2003; Schuurman y col., 2007; Gutiérrez-Cisneros y col., 2011; Ahmed y col., 2013; Elsafi y col., 2013; Banisch y col., 2015; Van den Bossche y col., 2015; Saura-Carretero y col., 2021). Por consiguiente, es importante tener presente que dichos inmunoensayos rápidos no deberían reemplazar a los exámenes rutinarios de microscopía debido a sus falsos negativos y a su incapacidad para poder detectar otros parásitos diferentes a los señalados en las pruebas (García y col., 2003; Schuurman y col., 2007; Nguyen y col., 2012; Saura-Carretero y col., 2021). En el caso de querer implementar estas PDR como método de diagnóstico de rutina, la decisión y elección de la marca a emplear tendrá que basarse en muchas variables, como pueden ser la población a analizar, la disponibilidad de personal capacitado en el ámbito de la microscopía, la facilidad de su uso y la rentabilidad diagnóstica (Van den Bossche y col., 2015).

Las principales características observadas en la comparación son (Anexo III. Tabla 3):

A) Sensibilidad y especificidad

Este método diagnóstico presenta una sensibilidad y especificidad adecuadas, tal y como se refleja en la Tabla 3 (Anexo III), aunque es preciso recalcar que ningún estudio de los presentes ha utilizado el “gold estándar” de referencia diagnóstico, esto es, 3 muestras de heces por paciente analizadas por microscopía.

La sensibilidad media obtenida por los estudios analizados ha sido del 91,4%. Un aspecto a destacar es la diferencia de sensibilidades reportadas en función de la marca comercial de PDR empleada (ImmunoCard STAT!®, Crypto-*Giardia* (CerTest), Strick *Crypto-Giardia* (Operon), *Giardia*-Strip®, RIDA®QUICK, *Crypto/Giardia* Duo-Strip, *Giardia/Cryptosporidium* Quick Check). Las marcas comerciales que mayor sensibilidad han reportado han sido *Giardia/Cryptosporidium* Quick Check™ e ImmunoCard STAT!®, ambas con una sensibilidad del 100% (Sadaka y col., 2015; Van den Bossche y col., 2015); mientras que la marca que menor sensibilidad ha reportado ha sido *Crypto/Giardia* Duo-Strip, con un valor del 65,5% (Van den Bossche y col., 2015). No se ha incluido en el cálculo de la sensibilidad media el resultado obtenido en el estudio llevado a cabo en 2016 por Korzeniewski y col., la cual fue del 5,3% por parte de RIDA®QUICK, ya que, como se ha comentado anteriormente, se piensa que este resultado tan bajo reportado se debe a una subestimación en la verdadera presencia de *Giardia lamblia* en las muestras (Korzeniewski y col., 2016).

Pese a que estos métodos de diagnóstico poseen una buena sensibilidad, y en la mayoría de los casos elevada, esta no supera a la aportada por el análisis microscópico, a excepción de 2 estudios en los que la sensibilidad de las PDR aumentó un 10% y un 9,5% respecto a la microscopía (Elsafi y col., 2013; Van den Bossche y col., 2015).

La sensibilidad de estas PDR se ve influenciada por varios aspectos: el anticuerpo utilizado en la prueba, la carga de parásitos presentes en las muestras fecales, la correcta homogeneización de la muestra y también la población investigada (García y col., 2003; Van den Bossche y col., 2015; Saura-Carretero y col., 2021). Sin embargo, y en contraposición a la carga parasitaria presente en la muestra, Nguyen y col., en su estudio de 2012, mostraron como 3 muestras de pacientes que al principio fueron negativas por parte de la microscopía y positivas por *Giardia*-Strip®, fueron positivas tras haber repetido ambos métodos diagnósticos, reflejando así que *Giardia*-Strip® es capaz de detectar cargas parasitarias bajas (Nguyen y col., 2012). A su vez, en el estudio de Banisch y col., del 2015, hubo 16 casos de giardiosis detectados únicamente por el ensayo inmuncromatográfico y no por el análisis microscópico, mostrando así la baja sensibilidad de la microscopía

en la detección de *Giardia lamblia* en áreas endémicas donde es frecuente que ocurra la cronicidad de la giardiosis y la infección repetida de la misma (Banisch y col., 2015). Cabe destacar como curiosidad que 9 de esos 16 casos no reportaron diarrea ni dolor abdominal, ya que las infecciones leves o asintomáticas se observan a menudo en pacientes con giardiosis de áreas endémicas (Banisch y col., 2015).

En cuanto a la especificidad, tal y como se ve reflejado en la Tabla 3 (Anexo III), esta es elevada, siendo la media obtenida de los estudios analizados del 98,5%. En este caso, y a diferencia de lo documentado en el caso de la sensibilidad, la marca de PDR empleada no parece haber influido en los valores. La especificidad más baja encontrada corresponde al valor de 93,8% (Van den Bossche y col., 2015) y la más elevada del 100% (García y col., 2003; Schuurman y col., 2007; Gutiérrez-Cisneros y col., 2011; Van den Bossche y col., 2015; Korzeniewski y col., 2016). En la mayoría de los estudios analizados, o el valor de la especificidad ha sido igual a la documentada por parte de la microscopía o esta ha sido un poco menor; sólo ha habido un estudio en el que se ha mostrado un aumento del 3% de la especificidad con el empleo del ensayo inmunocromatográfico (Schuurman y col., 2007).

Por lo tanto, estos ensayos inmunocromatográficos son métodos diagnósticos con una sensibilidad y especificidad adecuadas en el diagnóstico de la giardiosis, que requieren de una adecuada selección de la marca para poder efectuar un correcto diagnóstico.

B) Falsos negativos

La aparición de falsos negativos ha sido reportada por varios de los estudios analizados (García, y col., 2003; Schuurman y col., 2007; Gutiérrez-Cisneros y col., 2011; Nguyen y col., 2012; Elsafi y col., 2013).

La mayoría de estos resultados erróneos se han dado con muestras que poseían una carga parasitaria baja, por lo que pueden ser el reflejo de la limitación en la sensibilidad de estos ensayos (García y col., 2003; Elsafi y col., 2013); debido a ello, y usando las densidades ópticas (DO) del ProspectT ELISA como una medida semicuantitativa de la carga parasitaria en las muestras fecales, se mostró como las muestras con DO bajas pasan por alto más fácilmente por las PDR, haciendo que estas las clasifiquen como resultados falsos negativos (Van den Bossche y col., 2015). Los falsos negativos también pueden ser debidos a la excreción intermitente de quistes de *Giardia lamblia* en las heces, no superando así una de las principales desventajas del diagnóstico microscópico y mostrando así que un resultado negativo aportado por la inmuncromatografía no descarta la infección por *Giardia*, pero sí que puede estar asociado a una excreción insuficiente del antígeno (Schuurman y col., 2007; Korzeniewski y col., 2016). La sobrecarga del inmunoensayo rápido con antígenos de *Giardia lamblia* también pueden dar lugar a resultados falsos negativos, conociéndose esto como el fenómeno prozona (Schuurman y col., 2007; Elsafi y col., 2013). No obstante, también se han obtenido resultados falsos negativos en muestras en las que se había demostrado un elevado número de parásitos, sin encontrar en esos casos una explicación razonable del error, proponiendo así que estos resultados fueran debidos a una conservación o a una manipulación incorrecta de las muestras antes de la fijación y/o al uso de un fijador incorrectamente preparado (García y col., 2003).

C) Falsos positivos

La aparición de falsos positivos ha sido documentada por varios de los estudios analizados (Gutiérrez-Cisneros y col., 2011; Nguyen y col., 2012; Elsafi y col., 2013; Sadaka y col., 2015; Van den Bossche y col., 2015). Es difícil averiguar si estos falsos positivos son realmente falsos positivos. Algunos autores proponen que los resultados positivos arrojados por estos métodos inmunocromatográficos deberían ser corroborados por otra técnica diagnóstica como puede ser la microscopía o la PCR, o por ambas técnicas, ya que podrían contener un bajo número de parásitos no detectado por PCR o estar presentes inhibidores que hacen que la PCR sea negativa (Gutiérrez-Cisneros y col., 2011; Elsafi y col., 2013).

D) Tiempo

El ahorro de tiempo que conlleva el diagnóstico de la giardiosis por ensayos inmunocromatográficos ha sido reportado en la mayoría de los estudios analizados como la principal ventaja del método (Schuurman y col., 2007; Gutiérrez-Cisneros y col., 2011; Nguyen y col., 2012; Elsafi y col., 2013; Sadaka y col., 2015; Banisch y col., 2015; Van den Bossche y col., 2015).

El tiempo medio para proporcionar el resultado a través de estos ensayos es de aproximadamente 10-12 minutos por muestra (Garcia y col., 2003; Sadaka y col., 2015), que en comparación con el análisis microscópico supone la mitad o 1/3 menos del tiempo requerido; y en comparación con el ELISA, y pese a que con el ensayo inmunocromatográfico sólo se pueden analizar las muestras por separado, estos ensayos siguen siendo más rápidos en mostrar el resultados que el ELISA, ya que se requiere diez veces menos tiempo para detectar giardiosis (Sadaka y col., 2015).

El hecho de ser una técnica de diagnóstico rápida proporciona varias ventajas: permite una mejora en la atención de los pacientes afectos, disminuye las posibles situaciones de brotes al tener más tiempo para reportar enfermedades de declaración obligatoria, como es la giardiosis, y también proporciona una menor carga de trabajo para los técnicos, lo cual a su vez se traduce en una disminución del coste (Sadaka y col., 2015).

E) Coste

Cuando se maneja el término coste, hay que tener en cuenta no sólo el precio del ensayo por sí mismo, sino también el coste derivado del tiempo y de la mano de obra que es requerido para realizarlas.

Si bien es cierto que los costes de los reactivos de los cartuchos de las PDR son mayores que los empleados en los métodos rutinarios microscópicos, el precio de la mano de obra es considerablemente menor cuando se utilizan las PDR, debido a la rapidez con la que se obtienen los resultados y a la facilidad de su empleo (Garcia y col., 2003; Van den Bossche y col., 2015). En comparación con otros inmunoensayos, el reactivo del ELISA fue también menor que el del ensayo rápido ImmunoCard STAT!®, pero si también se tiene en cuenta, como en el caso anterior, el tiempo requerido para realizar cada prueba, el costo de ambos métodos diagnósticos casi se iguala (Sadaka y col., 2015). A su vez, y como ya se ha mencionado, estas PDR no requieren de equipos especiales para su lectura, a diferencia del ELISA y de la PCR, lo cual disminuye de forma considerable el precio de este método diagnóstico (Gutiérrez-Cisneros y col., 2011). Banisch y col., en su estudio de 2015 hablaban de un coste aproximado de 10\$ por muestra, precio que podría ser compensado por la mayor detección de giardiosis (Banisch y col., 2015).

5.2.2.3. INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD)

La inmunofluorescencia directa (IFD) es un inmunoensayo de antígenos basado en la detección de organismos intactos mediante el uso de marcadores de anticuerpos específicos anti-*Giardia* marcados, que emiten fluorescencia cuando se excitan con luz de longitud de onda adecuada. Dicha emisión de fluorescencia es observada con un microscopio que disponga de los filtros adecuados (Winiecka-Krusnell y col., 1995; Naham y col., 2013; Jahan y col., 2014). La IFD permite la demostración inmunocitológica de quistes y trofozoítos así como la detección de antígenos liberados por *Giardia lamblia*, proporcionando de esta manera la demostración de parásitos individuales que pueden ser pasados por alto mediante el método convencional microscópico (Winiecka-Krusnell y col., 1995). Las muestras analizadas por la tinción de anticuerpos fluorescentes directos (DFA) deben concentrarse, aplicarse en un portaobjetos y dejar que se sequen completamente al aire, teñirlas y leerlas con microscopía de fluorescencia; por consecuencia, el tiempo que se requiere para analizar las muestras por DFA es de aproximadamente 20 min (Aldeen y col., 1995).

Una mayor sensibilidad en la detección por IFD en comparación con la proporcionada por el análisis microscópico convencional se mostró en 1995 en el estudio de Winiecka-Krusnell y col., en el cual las muestras que contenían 400 o más quistes/ml de *Giardia lamblia* resultaron ser positivas por el examen mediante la IFD, mientras que para poder ser detectadas como positivas por el análisis microscópico convencional la concentración de quistes tenía que ascender a los 1.000/ml; a su vez, el número más bajo de quistes de *Giardia lamblia* detectados por IFD fue de 4 por preparación, mientras que el límite aportado por la microscopía convencional fue de 30 quistes por preparación (Winiecka-Krusnell y col., 1995). Se ha mostrado como la detección de quistes de *Giardia lamblia* puede aumentar del 10% (15 positivos de 50 muestras) con la microscopía convencional al 23% (35 positivos de 50 muestras) con el empleo de la IFD en aquellas muestras de pacientes con sospecha clínica de giardiosis (Winiecka-Krusnell y col., 1995). Algo semejante se apreció en el estudio de El-Nahas y col., de 2013, en el que conforme el número de quistes de *Giardia* detectados mediante la IFD disminuía, los falsos negativos por parte de la microscopía aumentaban; ya que el umbral

mínimo de detección de quistes por parte de la IFD fue de 500/g mientras que el de la microscopía fue de 1.800 quistes/g (El-Nahas y col., 2013). Por el contrario, en el estudio de 1995 de Aldeen y col., la IFD no mostró un incremento de la detección de giardiosis en comparación con la microscopía convencional, ya que ambos métodos mostraron una correlación del 100%, siendo la sensibilidad de ambas del 55% (Aldeen y col., 1995). La sensibilidad de la IFD tampoco fue mayor, sino que incluso fue menor que la aportada por la microscopía en el estudio de Ros y col., del 1995, ya que los valores fueron, respectivamente del 91,6% y del 95,8% (Ros y col., 1995).

Los resultados falsos negativos obtenidos por este método diagnóstico han sido atribuidos a la excesiva fluorescencia inespecífica que aparece a veces cuando se visualizan las muestras, no permitiendo de este modo detectar la presencia de quistes (Ros y col., 1995).

Una de las ventajas que ofrece el diagnóstico mediante la IFD es su uso en los brotes de *Giardia*, especialmente en ámbitos cerrados como son las escuelas de cuidado infantil, donde es necesario realizar una detección rápida de una gran cantidad de muestras, en el estudio de portadores del parásito (Aldeen y col., 1995; Ros y col., 1995). Como contrapunto, la IFD no es una técnica diagnóstica más asequible que el diagnóstico mediante la microscopía convencional (Aldeen y col., 1995; Ros y col., 1995; El-Nahas y col., 2013), ya que teniendo en cuenta tanto el precio de los materiales como de la mano obra, el coste total de este análisis es de 12,80\$ por muestra, mientras que el de la microscopía es de 11\$ (Aldeen y col., 1995).

No cabe duda de que la sensibilidad en la detección de quistes de *Giardia lamblia* puede ser mejorada mediante la tinción inmunofluorescente de los mismos, lo que resulta muy útil como procedimiento complementario cuando se dispone de una sola muestra de heces, que resulta negativa por microscopía, siendo muy alta la sospecha clínica y epidemiológica de giardiosis (Winiecka-Krusnell y col., 1995; El-Nahas y col., 2013). Además, en el estudio de 2013 de El-Nahas y col. se expone que, al presentar la IFD un valor predictivo positivo elevado (90,7%) cuando se analizan muestras humanas, la IFD puede ser útil tanto para diagnosticar como para excluir la infección por *Giardia lamblia* en lugar del análisis microscópico convencional de las 3 muestras de heces consecutivas (El-Nahas y col., 2013). El problema es que su elevado coste no permite su uso de forma indiscriminada (Ros y col., 1995).

Pese a ser una técnica rápida y sencilla, la IFD es menos económica y no puede detectar otras estructuras parasitarias, de tal modo que no puede sustituir al análisis microscópico, haciendo de la microscopía la primera opción diagnóstica a emplear en el diagnóstico de la giardiosis (Ros y col., 1995; El-Nahas y col., 2013).

5.2.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La giardiosis es una enfermedad que a menudo puede ser pasada por alto durante las pruebas diagnósticas convencionales microscópicas y serológicas (Elsafi y col., 2013; Mejia y col., 2013). Es por ello que las técnicas moleculares basadas en la amplificación y detección del ADN de *Giardia lamblia* pueden dar un vuelco a las técnicas de diagnóstico de la giardiosis. La PCR mejora el diagnóstico de la giardiosis al presentar una excelente especificidad y sensibilidad en comparación con los métodos de microscopía y de detección de antígenos a la hora de analizar una sola muestra fecal (Díaz-Carbonell y col., 1996; ten Hove y col., 2007; Schuurman y col., 2007; ten Hove y col., 2009; Calderaro y col., 2010; Stark y col., 2011; Nazeer y col., 2013; Elsafi y col., 2013; Laude y col., 2016; Silva y col., 2016). Así, por ejemplo, Gotfred-Rasmussen y col., en 2016, mostraron un estudio en el que se analizaron 28.185 muestras de heces, detectando *Giardia* en el 4,7% de ellas por técnicas moleculares, aunque solamente el 58,1% de estos positivos habían resultado positivas por microscopía (Gotfred-Rasmussen y col., 2016).

Varios son los tipos de análisis basados en la PCR que se encuentran disponibles hoy en día, desde la PCR convencional, en sus modalidades simple o anidada y la RT-PCR (Real Time PCR, PCR en tiempo real), mucho más moderna y rápida y todas ellas han sido consideradas más sensibles que el diagnóstico por microscopía y que el inmunodiagnóstico (ten Hove y col., 2007; ten Hove y col., 2009; Calderaro y col., 2010; Nazeer y col., 2013; Laude y col., 2016; Soares y col., 2016; Batra y col., 2016).

Todas las técnicas moleculares requieren un primer paso de extracción del ADN del parásito. En el pasado, el aislamiento del ADN, era laborioso y problemático por la complejidad de la muestra de heces; además, la

amplificación y detección del ADN eran sensibles a la contaminación, costosas tanto en términos monetarios como en términos de tiempo y sólo podían detectar un objetivo por reacción (Verweij y col., 2003; ten Hove y col., 2007). Es por ello que Schuurman y col., en su estudio de 2016 sugerían que, aunque la RT-PCR fuera el método más sensible para el diagnóstico de la infección por *Giardia lamblia*, existía un elevado riesgo de contaminación cruzada y por ello proponían que la RT-PCR todavía debería de emplearse en los laboratorios como un método diagnóstico complementario al análisis microscópico de las heces (Soares y col., 2016). Un resultado negativo por parte de la PCR no descarta por completo la presencia de *Giardia lamblia* en heces, ya que la interferencia de los inhibidores de la PCR presentes en las muestras fecales pueden dificultar la amplificación del ADN (Silva y col., 2016). Los resultados falsos negativos aportados por la PCR se han atribuido a las dificultades en la extracción del ADN de *Giardia lamblia*, a la degradación o mutaciones del ADN y a la presencia de inhibidores del ADN polimerasa en las heces que impiden la amplificación del gen diana (Silva y col., 2016). Debido a la baja cantidad del parásito en las muestras, la PCR clásica para *Giardia* es habitualmente una nested-PCR, lo que encarece el análisis, que además requiere mucho más tiempo para su realización.

Hoy en día, se han desarrollado métodos simples y efectivos para el aislamiento del ADN en heces, pudiendo extraerlo fácilmente mediante kits basados en columnas con membranas que retienen el ADN, que puede ser posteriormente eluído (Verweij y col., 2003; Nazeer y col., 2013; Elsafi y col., 2013). No obstante, no siempre se asegura la rotura de los quistes en la extracción ni la completa eliminación de los inhibidores de la PCR.

A su vez, el desarrollo de la PCR multiplex ofrece la posibilidad de detección múltiple de diferentes parásitos, virus y bacterias en un único proceso de trabajo, superando así una de las limitaciones comentadas para la técnica (Verweij y col., 2003; ten Hove y col., 2007; ten Hove y col., 2009; Nazeer y col., 2013; Gotfred-Rasmussen y col., 2016). No obstante, el papel de la PCR multiplex en tiempo real como herramienta diagnóstica de rutina en un laboratorio clínico requiere una evaluación adicional con respecto a la detección a gran escala y a la mejora del diagnóstico de los pacientes (ten Hove y col., 2007).

La introducción de la RT-PCR con sondas de detección fluorescentes puede ser cuantitativa, permitiendo así establecer la carga del patógeno, permite la semi-automatización del procedimiento diagnóstico y puede reducir el riesgo de contaminación, el tiempo de trabajo y los costes de los reactivos (Verweij y col., 2003; ten Hove y col., 2007; Nazeer y col., 2013; Elsafi y col., 2013; Gotfred-Rasmussen y col., 2016). La cuantificación en el caso de parásitos es menos frecuente por las dificultades en su cultivo para determinar una recta de calibrado. Así, la opción de futuro en que, esta RT-PCR empleada en el diagnóstico de *Giardia lamblia* podría combinarse con un control de inhibición y con ensayos en tiempo real para otros patógenos como son *Entamoeba histolytica*, *Cyclospora cayetanensis* o *Cryptosporidium parvum/Cryptosporidium hominis*, agentes implicados con frecuencia en la producción de diarrea, se está materializando (Verweij y col., 2003; ten Hove y col., 2007). El desarrollo de ensayos de PCR multiplex para la detección de protozoos causantes de diarrea y el desarrollo de procedimientos automatizados de aislamiento del ADN está generando cambios radicales en la práctica habitual de la parasitología, permitiendo un enfoque diagnóstico de alto rendimiento (Verweij y col., 2003; ten Hove y col., 2007; ten Hove y col., 2009).

Si bien es cierto que tanto la microscopía como la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) dependen de la presencia del parásito en la muestra, esta última es capaz de detectar pequeñas cantidades de ADN específico del parásito, lo cual es una diferencia importante a tener en cuenta, ya que es la responsable de la mejora en la sensibilidad y en la especificidad del diagnóstico de giardiosis (Mejia y col., 2013).

El aislamiento, la amplificación y la detección del ADN de una forma más fácil y rápida, abre caminos para el uso de esta técnica como un método diagnóstico de rutina en los laboratorios de parasitología (Verweij y col., 2003). No obstante, se debe ser cauto a la hora de analizar las muestras de *Giardia lamblia* en heces ya que el ADN de este parásito puede estar presente en las heces una vez pasada la infección, generando así resultados falsos positivos (Gotfred-Rasmussen y col., 2016). Este hecho también puede confundir en los casos de reinfección tras una infección reciente, en el que se puede sospechar un falso positivo cuando en realidad se trata de un verdadero positivo (Gotfred-Rasmussen y col., 2016).

A pesar de todo, la principal limitación que actualmente presenta la PCR multiplex en tiempo real es su coste más elevado en comparación con los métodos diagnósticos de microscopía e inmunoensayos, dificultando así su introducción en aquellos países con recursos limitados (Mejia y col., 2013). No obstante, algunos estudios han reportado nuevos datos acerca de los costes monetarios de la misma, presentándose como una técnica más rentable y pudiendo plantearse su introducción en los países en desarrollo (Calderaro y col., 2006; Stark y col., 2011; Nazeer y col., 2013; Mejia y col., 2013).

En el caso de la PCR siempre se debe de tener presente que se detecta ADN y por lo tanto, esto no asegura la presencia de parásito viable, por lo que una PCR positiva con microscopía negativa requiere de la decisión del médico para evaluar la necesidad de tratamiento, considerando el antecedente epidemiológico y la sintomatología.

Las principales características observadas en la comparación son (Anexo IV. Tabla 4):

A) Sensibilidad

En este apartado, es necesario tener en cuenta que en ninguno de los estudios se ha llevado a cabo la comparación del diagnóstico mediante la PCR con el estándar de referencia, esto es, con el análisis microscópico de 3 muestras por paciente, ya que la gran mayoría de los estudios analizados en la presente revisión han empleado como estándar de referencia la microscopía empleando una sola muestra de heces o la combinación de varios métodos diagnósticos, entre los que se incluyen la microscopía con la IC y/o el ELISA y/o la IFD y/o una PCR de referencia externa a la examinada. Esta observación también fue mencionada por Laude y col., los cuales relatan en su estudio de 2016 que, en la mayoría de veces, el rendimiento diagnóstico de la PCR es difícil de evaluar, ya que no siempre es comparada con la misma técnica de referencia y muchas veces se establecen controles con PCR de referencia (Laude y col., 2016).

En resumen, y como se puede apreciar por los datos aportados en la Tabla 4 (Anexo IV), las sensibilidades obtenidas para la PCR utilizada como técnica de diagnóstico, son elevadas, con un valor medio de los estudios analizados del 97,48%, siendo la sensibilidad más baja encontrada del 91% (Gotfred-Rasmussen y col., 2016), y la más elevada del 100% (Schuurman y col., 2007; Calderaro y col., 2010; Stark y col., 2011; Van Lint y col., 2013; Elsafi y col., 2013; Hawash y col., 2016; Batra y col., 2016). Parece importante detenerse en el estudio de 2016 de Gotfred-Rasmussen y col., el cual ha mostrado la sensibilidad más baja por parte de la PCR (91%), para recalcar un detalle de su estudio, y es que esa sensibilidad del 91% proporcionada por la PCR fue el resultado de comparar dicho método diagnóstico únicamente con la inmunofluorescencia (IF), haciendo de esta el estándar de referencia, y no comparándola siquiera con el análisis de una muestra por microscopía (Gotfred-Rasmussen y col., 2016).

En la mayoría de los estudios analizados, la sensibilidad aportada por la PCR ha sido superior en comparación a la obtenida por análisis microscópico (Verwei y col., 2003; ten Hove y col., 2007; Schuurman y col., 2007; ten Hove y col., 2009; Stark y col., 2011; Nazeer y col., 2013; Van Lint y col., 2013; Elsafi y col., 2013; Mejia y col., 2013; Hawash y col., 2016; Laude y col., 2016; Gotfred-Rasmussen y col., 2016 y Batra y col., 2016). No obstante, esto no fue respaldado en el estudio llevado a cabo por Calderaro y col. en el 2010, en el que las sensibilidades tanto de la PCR como del análisis microscópico fueron las mismas, del 100%, pudiendo afirmar que la PCR es una técnica muy sensible, pero no pudiendo afirmar que fuera más sensible que la microscopía (Calderaro y col., 2010). A su vez, en el estudio llevado en 2020 a cabo por Akgun y col., tampoco se apreció un aumento de la sensibilidad por parte del panel múltiple BD MAXTM Enteric Parasite Panel, en el que los autores documentaron que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos métodos diagnósticos (Akgun y col., 2020).

Otros autores como, Elsafi y col., observaron en su estudio de 2013 una sensibilidad más baja para el diagnóstico por microscopía en una sola muestra de heces. La excreción intermitente y/o el bajo número de los quistes de *Giardia lamblia* podría ser el motivo, superando ese inconveniente mediante el empleo de la PCR (Elsafi y col. 2013). También Verweij y col., mostraron en su estudio de 2003 el hallazgo de 4 casos de pacientes en los que la microscopía no mostró ser positiva hasta la segunda o tercera muestra examinada de cada paciente, mientras que la RT-PCR mostró ser positiva en la primera muestra de cada paciente (Verweij y col., 2003).

Esto se confirma cuando se utiliza la RT-PCR y se compara con la microscopía. En el estudio llevado a cabo por Van Lint y col., en el 2013, se encontraron 18 casos de giardiosis únicamente detectados por la PCR, con Ct altos, lo cual se traduce en la presencia de una carga parasitaria baja en las 18 muestras (Van Lint y col., 2013). No obstante, Schuurman y col., comentaron en su estudio de 2007 que aunque la mayor sensibilidad por parte de la PCR esté demostrada, no indica que nunca arroje valores erróneos o que haya que olvidarse de la clínica presentada por el paciente, ya que detectar pequeñas cantidades de carga parasitaria no indica que el paciente se encuentre realmente infectado, porque el ADN de *Giardia lamblia* puede estar presente en las heces del sujeto una vez pasada la infección, por lo que tendría que ser el clínico el que interprete ese resultado junto con los datos del paciente (Schuurman y col., 2007). La realidad es que en estos casos es difícil tomar la decisión de considerarlos falsos positivos, ya que el no ver el parásito cuando se observa la preparación al microscopio solo indica que no se encontraba en esa pequeña cantidad de la muestra, al menos en la cantidad suficiente para poder ser observado, no teniendo constancia de su ausencia absoluta.

Otros autores también han considerado como resultados falsos negativos por parte de la microscopía aquellos en los que la PCR arrojaba valores positivos: En el estudio de 2007 de Schuurman y col., hubo un caso falso negativo no detectado por el análisis microscópico y si por la RT-PCR y por inmunocromatografía; caso semejante es el mostrado por Stark y col., en el 2011, en el que la microscopía no pudo detectar 14 casos que si fueron detectados tanto por la PCR multiplex como por la RT-PCR; lo mismo ocurrió en el caso del estudio de 2013 de Van Lint y col., con 18 casos; así como en 3 casos en el estudio de 2016 de Laude y col. y en los 4 casos del estudio de 2016 de Batra y col. No obstante, hay que considerar que el rendimiento diagnóstico de la PCR a veces es difícil de valorar ya que se hacen comparaciones con PCR de laboratorios externos, y eso mismo es lo que ha pasado en 4 de los estudios analizados, en los que se quería comparar una PCR específica con el diagnóstico microscópico y en el caso de que los resultados fuesen discrepantes, se comparaban con una PCR externa (Stark y col., 2011; Van Lint y col., 2013; Laude y col., 2016; Batra y col., 2016).

Otro estudio que se quiere destacar es el llevado a cabo en 2013 por Nazeer y col., en el que se compararon los resultados obtenidos por el análisis microscópico con los obtenidos por PCR multiplex en tiempo real, utilizando para ello como estándar de referencia a la propia PCR multiplex en tiempo real. La sensibilidad mostrada por microscopía fue baja, (57,8%) y con un total de 62 casos falsos negativos (Nazeer y col., 2013). En este tipo de estudios, Laude y col. comentaban que no siempre se compara el rendimiento de la PCR con el mismo estándar de referencia, dificultando así la evaluación de la misma (Laude y col., 2016).

Verweij y col., al reportar en su estudio de 2003 una mayor sensibilidad por parte de la PCR en comparación con la microscopía, abogan por que la PCR sea una técnica factible en el diagnóstico de rutina de la giardiosis (Verweij y col., 2013). No obstante, y como ya se ha comentado, es necesario considerar varios factores importantes: en primer lugar, la detección de ADN, no garantiza la presencia del parásito en forma viable. Además, la utilización de las heces como muestra, implica la posible presencia de inhibidores, que en ocasiones producen resultados negativos, y en ello influye también cual sea la reacción elegida, pero esto se valora en apartados posteriores.

B) Especificidad

Los valores de especificidad reportados por los estudios analizados en la presente revisión se reflejan en la Tabla 4 (Anexo IV). Si se calcula el valor medio de la especificidad de la PCR en los diferentes estudios analizados, este es elevado (97,6%), siendo la más baja la reportada del 92% (Schuurman y col., 2007) y la más elevada del 100% (Calderaro y col., 2010; Stark y col., 2011; Van Lint y col., 2013; Hawash y col., 2016; Batra y col., 2016). Las diferencias entre las dos técnicas son muy altas, 100% para la PCR, disminuyendo al 86,7% en el caso de la microscopía (Calderaro y col., 2010), o mucho más sutiles, 100% para la PCR y del 99,58% para microscopía según el estudio consultado (Batra y col., 2016). En otros 2 estudios la especificidad de la PCR mostró ser igual a la de la microscopía, siendo ambas y en ambos estudios del 100% (Stark y col., 2011; Van Lint y col., 2013). Una menor especificidad por parte de la PCR en comparación con la microscopía también ha sido reportada en 2 estudios: en el estudio llevado a cabo por Schuurman y col., en el 2007, la especificidad para la PCR fue del 92%, ascendiendo al 97% en el caso del análisis microscópico (Schuurman y col., 2007); a su vez, en el estudio de 2013 de Elsafi y col., se reportó una especificidad del 98,4% por parte de la PCR, siendo del 100% para la microscopía (Elsafi y col., 2013). En adición, Gotfred-Rasmussen y col., en su estudio de 2016

encontraron que la menor especificidad por parte de la qPCR en comparación con otros métodos diagnósticos era debida a la merma en la detección de algunas muestras verdaderamente positivas y a la probable contaminación cruzada con otras muestras (Gotfred-Rasmussen y col., 2016).

Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos, se puede afirmar que la PCR es una muestra diagnóstica que proporciona una elevada especificidad en el diagnóstico de la giardiosis, al nivel de la microscopía, no pudiendo afirmar del mismo modo que se trate de una prueba con mayor o con menor especificidad que la microscopía. La diferencia entre los resultados obtenidos está determinada por la reacción de PCR elegida, tanto del tipo de PCR (PCR clásica o RT-PCR) como de los oligonucleótidos y las condiciones utilizadas. También la naturaleza de la muestra es un factor a tener en cuenta, ya que al tratarse de una muestra sucia, existen diferencias entre ellas en la conservación de los quistes de *Giardia* y en la presencia de inhibidores de la PCR. Por último, la realización de un pretratamiento también determina la posible concentración de la muestra, una mejor extracción del ADN por una mejor rotura de los quistes y la eliminación de inhibidores de la reacción de PCR.

C) Falsos negativos

La obtención de resultados falsos negativos en el diagnóstico por PCR no es extraño, ya que ha sido reportado en algunos de los estudios revisados (Verweij y col., 2003; ten Hove y col., 2007; ten Hove y col., 2009; Hawash y col., 2016; Laude y col., 2016).

En el estudio llevado a cabo en 2003 por Verweij y col. se obtuvieron 2 resultados falsos negativos mediante la RT-PCR y los autores mostraron que estos resultados no fueron causados por la inhibición de la reacción de amplificación, sino que posiblemente fue debido al tamaño de la muestra de la que se aisló el ADN, ya que aunque reportaron que se usó aproximadamente la misma cantidad de heces (< 0,5 g/ml) para el aislamiento del ADN en todos los casos, a veces el aislamiento de ADN se realizó dejando solo una cantidad mínima de heces en el recipiente de recolección (Verweij y col., 2003).

En el estudio de ten Hove y col., del año 2007, se detectó un único caso falso negativo por parte de la PCR multiplex, ya que en dicho caso se demostró mediante el análisis microscópico la presencia de quistes de *Giardia lamblia* en la muestra de heces, poniendo así de manifiesto la no infalibilidad por parte de la PCR (ten Hove y col. 2007). Algo semejante ocurrió en otro estudio de los mismos autores en el año 2009, en el que se reportaron 2 casos falsos negativos por parte de la PCR que sólo fueron detectados por microscopía (ten Hove y col., 2009).

Siguiendo en la misma línea, en el estudio de 2016 de Laude y col., los autores mostraron la presencia de 3 resultados falsos negativos aportados por la PCR multiplex detectados como positivos por el análisis microscópico. En dicho estudio, a pesar de que esas 3 muestras se volvieron a someter a otra ronda de extracción de ADN, el resultado siguió saliendo negativo, mientras que al volver a ser examinadas por parte de dos parasitólogos expertos, estas resultaron de nuevo positivas, mostrando que la carga parasitaria en dichas muestras era baja, sugiriendo así los autores que se debe prestar especial atención a la homogeneización de las heces así como al hisopado fecal, que probablemente son un paso esencial en el proceso, ya que la cantidad de heces utilizadas para la extracción de ADN es inferior a la que se necesita para llevar a cabo el análisis microscópico (Laude y col. 2016).

En el último estudio en el que se revelaron casos falsos negativos fue el llevado a cabo en 2016 por Hawash y col., en el que también se apreciaron 3 resultados falsos negativos por parte de la PCR-RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), en el que la microscopía mostró una carga parasitaria baja (Hawash y col., 2016).

Los resultados falsos negativos por parte de la PCR se han atribuido a las dificultades en la extracción del ADN del parásito, a la degradación o a mutaciones del ADN y a la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa en las heces que impiden la amplificación del gen diana (Silva y col., 2016). Esta inhibición de la PCR ha sido evidenciada en algunos de los estudios analizados. Por ejemplo, en el estudio de 2013 de Van Lint y col., se reportó inhibición de la PCR en 18 muestras de las 631 muestras con las que inicialmente se iba a realizar el estudio (que como resultaron ser negativas mediante el análisis microscópico, los autores

decidieron omitirlas del estudio) (Van Lint y col., 2013). A su vez, Laude y col., observaron inhibición en una muestra de las 185 analizadas por parte de la G-DiaParaTrio multiplex PCR (Laude y col., 2016).

Por ello, es importante tener presente el concepto de que un resultado negativo aportado por la PCR no descarta la presencia del parásito debido a que la interferencia de los inhibidores de la PCR presentes en las heces pueden dificultar la amplificación del ADN (Silva y col., 2016).

Por todo lo mencionado, hay que tener que cuenta que, pese a que la PCR ha mostrado ser una técnica altamente sensible en el diagnóstico de la giardiosis, no está exenta de errores en la detección de la misma, pudiendo atribuirse esta merma de la detección o a los fallos internos de la misma o a fallos producidos en la preparación de las muestras. Otro de los factores que favorece la aparición de falsos negativos es la gran variabilidad de los genes de *Giardia* utilizados como diana para las PCR. Podría darse el caso de que variaciones en la región utilizada como oligonucleótidos o primers en la PCR impida la hibridación de los mismos y por lo tanto la PCR resulte negativa. Esta hipótesis se encuentra motivada por el resultado negativo obtenido en muestras con alto número de quistes que incluso habían sido sometidas a tratamiento previo de concentración y purificación.

D) Falsos positivos

El hallazgo de falsos positivos no ha sido tan documentado como los falsos negativos, pero tampoco se ha mostrado ausente en los estudios analizados, ya que tanto Schuurman y col., en su estudio de 2007, como Elsafi y col., en su estudio de 2013, así como Gotfred-Rasmussen y col., en su estudio de 2016, han reportado resultados falsos positivos en los mismos.

En el estudio de 2007 de Schuurman y col. la RT-PCR mostró 8 resultados falsos positivos, habiendo una fuerte sospecha por parte de los autores de que fuesen el resultado de la contaminación cruzada. Es por ello que estos autores opinaban que, a pesar de que la RT-PCR parece ser el método más sensible en la detección de *Giardia lamblia*, todavía no ofrece ventajas adicionales cuando se utiliza como prueba única de diagnóstico, principalmente debido al riesgo de resultados falsos positivos (Schuurman y col., 2007).

En el estudio de Elsafi y col., de 2013, la RT-PCR mostró un resultado falso positivo, y dichos autores lo atribuyeron a una posible contaminación, haciendo hincapié en el hecho de que dicho método diagnóstico requiere de atención en su desempeño (Elsafi y col. 2013).

Para terminar con este concepto, en el estudio de Gotfred-Rasmussen y col., del 2016 (estudio destacado que en el apartado de la sensibilidad por usar como método de referencia a la inmunofluorescencia en vez de a la microscopía), no se mostró un dato numérico concreto de resultados falsos positivos, sino que se habló de una tasa de falsos positivos del 50%. En vista de los resultados, estos autores señalaron que no existe una prueba de referencia en el diagnóstico de la giardiosis y que, por lo tanto, se desconoce si esa tasa de falsos positivos del 50% obtenida por parte de la RT-PCR es el verdadero reflejo de la realidad o si simplemente sugiere una mayor sensibilidad por parte de dicho método diagnóstico. Siguiendo con este asunto, los autores recomendaban en su estudio que los resultados positivos obtenidos por la RT-PCR debían ser verificados por la técnica de inmunofluorescencia; esta sugerencia se realizó en base a los resultados mostrados en su estudio en los que 19 muestras positivas para *Giardia lamblia*, que inicialmente fueron positivas para la IF, no documentaron ninguna diferencia estadísticamente significativa entre la IF y la RT-PCR (Gotfred-Rasmussen y col., 2016).

E) Tiempo

En varios estudios analizados en la presente revisión se califica positivamente a la PCR como una prueba diagnóstica rápida (Calderaro y col., 2010; Stark y col., 2011; Laude y col., 2016; Gotfred-Rasmussen y col., 2016; Batra y col., 2016).

A pesar de que en el estudio de 2011 llevado a cabo por Stark y col., mencionan, como punto fuerte, que el tiempo total requerido para llevar a cabo el diagnóstico mediante la PCR fue menor a 3 horas (Stark y col., 2011), el único estudio analizado en el que se compara con unidades de tiempo es en el de Batra y col. del año 2016, en el que tiempo medio requerido para analizar las 275 muestras por la PCR completamente automatizada fue de 4 horas, mientras que para el análisis microscópico se requirieron 65 horas, pudiendo

apreciarse un gran ahorro de tiempo por parte del diagnóstico de la PCR para nada desdeñable (Batra y col., 2016). Es por ello que estos autores recalcan la clara diferencia de tiempo que requieren ambos métodos como un punto a favor para la PCR, ya que al ser un ensayo altamente automatizado libera tiempo para que el personal de laboratorio pueda realizar otras labores, a la vez que se cree que sería una buena estrategia diagnóstica a la hora de tener que analizar múltiples muestras de heces como por ejemplo puede ocurrir en casos de brotes o en casos de cribado de viajeros (Batra y col., 2016). Es preciso, no obstante, tener en cuenta que a esto hay que sumar el tiempo que se precisa para la extracción del ADN, que es variable en función de la técnica utilizada y de si se utiliza algún pretratamiento de la misma.

No obstante, se quiere puntualizar el término de rapidez en esta situación: como ya se ha comentado en esta revisión, el tiempo medio requerido para una única muestra de heces mediante el método tradicional microscópico es de aproximadamente de unos 20-30 min, mientras que el tiempo medio requerido por parte de la PCR es de un mínimo de 2,5 horas solo para la reacción, debiendo de contar además la extracción de ADN, que se eleva si se realiza algún pretratamiento que puede tardar hasta 24 horas, así pues, la PCR requiere de más tiempo que el análisis microscópico. Si la PCR que se realiza es una PCR anidada y es PCR convencional, que requiere la visualización de los resultados mediante electroforesis, el tiempo necesario puede aumentarse hasta las 48 horas. Sin embargo, la PCR posee la gran ventaja de que varias muestras pueden ser analizadas a la vez, pudiendo obtener en ese tiempo mínimo de 2,5 horas el resultado de 96 muestras, mientras que el análisis microscópico sólo permite el examen de una única muestra. Es por ello que cuando grandes cantidades de muestras requieren ser analizadas, el costo de tiempo es mucho menor si se emplea la PCR en comparación con la microscopía.

F) Precio

Por lo general, casi todos los estudios presentes en esta revisión revelan el inconveniente del precio más elevado por parte de la PCR en comparación con la microscopía, debido al mayor coste del material requerido para la PCR. Tal y como apoyaban Nazeer y col. en su estudio de 2013, esta es una de las principales limitaciones que presentaba la PCR para poder implementarse en los países en vías de desarrollo cuando esta técnica se introdujo para diagnóstico (Nazeer y col., 2013). En la actualidad los materiales y reactivos para la PCR clásica han bajado considerablemente de precio y se encuentran más al alcance de todos los laboratorios.

No obstante, el término precio es un poco ambiguo, ya que hay estudios en los que sólo se cuenta para establecer el precio los materiales empleados, mientras que hay otros que incluyen también en el precio la mano de obra. Además, cuando se analiza el elevado coste por parte de la PCR y se dice que la microscopía es más barata, no se tiene en cuenta el precio que en su día costó el microscopio, por lo tanto, sólo se tiene en cuenta en el precio de la microscopía los medios de concentración, las tinciones, los porta objetos y a eso se le puede sumar la mano de obra también. Siguiendo en esta línea, Mejia y col. concluyeron en su estudio de 2013 que, sin tener en cuenta el precio del equipo (que puede oscilar entre 25.000 y 50.000 euros) para poder realizar la qPCR, el precio por muestra fecal analizada por la qPCR era de 1 dólar americano, mientras por el examen microscópico ascendía a 2,60 dólares americanos (Mejia y col., 2013).

En el estudio de 2013 de Nazeer y col., a pesar de opinar que el reemplazo del análisis microscópico por la PCR se ve impedido por su elevado coste en los países en vías de desarrollo, también se mostró una disminución de los costes con el empleo de una PCR multiplex en tiempo real, ya que el hecho de que en una misma muestra de heces se pudieran analizar varios parásitos resultó más barato que el hecho de tener que haber analizado esos mismos parásitos a través de la microscopía, haciendo de la PCR multiplex una prueba muy eficaz. Es por ello que estos mismos autores sugirieron en su estudio una posible implementación de esa PCR multiplex en tiempo real, al menos en los laboratorios de referencia de los países en desarrollo donde la prevalencia multiparasitaria en un mismo paciente es frecuente, ya que así se reducirían los costes al detectar varios parásitos en una misma prueba y al impedir el tratamiento innecesario tras un diagnóstico erróneo (Nazeer y col., 2013).

Hawash y col., calificaron a la PCR-RFLP como una técnica relativamente económica, aunque no se dispone de datos numéricos en su estudio (Hawash y col., 2016).

Por lo tanto, a veces se tiende a emplear más el término rentable, que sólo el término económico, ya que el primero incluye no solo el coste de los materiales requeridos, sino también la mano de obra y el tiempo. Como se ha explicado en el apartado anterior, la PCR permite un ahorro en el tiempo de trabajo en comparación con la microscopía, y ese tiempo ahorrado es precio de ahorro en la mano de obra o bien es tiempo que podría aprovecharse por parte de los trabajadores en otras tareas de laboratorio, optimizando el tiempo y resultando, por lo tanto, en un aumento de la rentabilidad (Calderaro y col., 2010; Stark y col., 2011).

G) Mano de obra

Bien es sabido que el diagnóstico de la giardiosis mediante el análisis microscópico requiere de profesionales capacitados (Elkadi y col., 1992; Rosenblatt y col., 1993; Aldeen y col., 1995; Díaz-Carbonell y col., 1996; Mank y col., 1997; Schunk y col., 2001; Verweij y col., 2003; Vidal y col., 2005; ten Hove y col., 2007; Schuurman y col., 2007; ten Hove y col., 2009; Nazeer y col., 2013; Van Lint y col., 2013; Mejia y col., 2013; Jahan y col., 2014; Sadaka y col., 2015; Van den Bossche y col., 2015; Hawash y col., 2016; Korzeniewski y col., 2016; Soares y col., 2016; Batra y col., 2016; Akgun y col., 2020). Es aquí donde varios autores hablan de que el diagnóstico llevado a cabo por PCR puede superar ese obstáculo de la microscopía, ya que se trata de una herramienta de uso sencillo y que no requiere de personal con mucha experiencia en el ámbito de la biología molecular (Stark y col 2011; Hawash y col., 2016; Laude y col., 2016). Sin embargo, esta opinión existente no es cierta. Si bien es cierto que tanto la preparación como la reacción de la muestra para la PCR pueden ser llevadas a cabo por un técnico, al igual que ocurre con la microscopía, la interpretación de los resultados puede complicarse en ocasiones; a su vez, la experiencia y formación en Biología Molecular es imprescindible para su interpretación.

H) Disminución en la cantidad de muestras para llegar al diagnóstico

Como ya se ha recalcado, la mayoría de los estudios no comparan la técnica de la PCR en una única muestra de heces con el análisis microscópico de 3 muestras de heces.

No obstante, esta particularidad sí fue observada en el estudio de 2003 de Verweij y col., (ya comentado) en el que hubo 4 pacientes que no arrojaron resultados positivos por microscopía hasta haber analizado 2-3 muestras, mientras que con el diagnóstico mediante la RT-PCR los resultados positivos se obtuvieron al analizar una única muestra, mostrando así la menor necesidad de muestras por parte de la PCR en comparación con el análisis tradicional microscópico (Verweij y col., 2003).

I) Flexibilidad en el tratamiento de las muestras

En el estudio de 2013 de Mejia y col., los autores reflejaron la ventaja de la qPCR de su mayor flexibilidad en cuanto al tratamiento de las muestras, ya que reportaron que estas muestras podrían analizarse inmediatamente tras la recogida de las mismas, almacenarse en temperatura ambiente en etanol al 70% o incluso almacenarse en un refrigerador a la temperatura de 4°C durante largos períodos de tiempo (evitando así también el gasto que conlleva almacenar las muestras en un congelador) (Mejia y col., 2013). La realidad es que en la práctica la utilización de disolventes o fijadores orgánicos como el etanol, supone un inconveniente para la PCR y producen interferencias.

Hay que considerar que además la PCR permite el análisis de otro tipo de muestras como puede ser una biopsia obtenida por endoscopia. El análisis tradicional para la presencia de *Giardia* en determinadas patologías, consiste en la realización de un frotis en un portaobjetos que posteriormente se observa al microscopio. La probabilidad de detectar el parásito es muy baja a no ser que este se encuentre en elevadas cantidades. La digestión de la biopsia, previa a la realización de la PCR, garantiza la presencia de ADN del parásito si este se encuentra presente y aumenta por lo tanto la probabilidad de detectarlo.

J) No detección de otros parásitos

Si hay que destacar una ventaja por parte de la microscopía en comparación con la PCR, es su capacidad para poder detectar, en una misma muestra, otros parásitos diferentes a *Giardia lamblia* (Aldeen y col., 1995; Elsafi y col., 2013; Korzeniewski y col., 2016; Silva y col., 2016; Soares y col., 2016).

Este hecho ha sido documentado en varios de los estudios aquí analizados, inclinando la balanza a favor de no reemplazar el análisis microscópico por la PCR (ten Hove y col., 2007; Schuurman y col., 2007; ten Hove y col., 2009; Calderaro y col., 2010; Van Lint y col., 2013; Hawash y col., 2016; Laude y col., 2016; Gotfred-Rasmussen y col., 2016; Batra y col., 2016).

Dónde mejor se aprecia la detección de otros parásitos por parte de la microscopía, que pese a no ser tan comunes también son causantes de sintomatología gastrointestinal, es en el caso de pacientes inmunodeprimidos y en viajeros, es por ello que en el estudio de 2013 llevado a cabo por Van Lint y col. se propuso combinar la microscopía con la RT-PCT en ese subtipo de pacientes (viajeros e inmunodeprimidos), dejando el diagnóstico únicamente mediado por la PCR, sin necesidad de combinarse con el análisis microscópico, en el caso de los pacientes inmunocompetentes (Van Lint y col., 2013).

No obstante, se debe remarcar el estudio llevado a cabo en 2013 por Mejia y col., el cual ha sido la excepción en este aspecto. En este estudio, se compararon los resultados obtenidos por el análisis microscópico con una PCR cuantitativa multiparalela (qPCR) la cual permitía cuantificar e identificar *Ascaris lumbricoides*, *Cryptosporidium* spp. (*C.parvum/ C. hominis*), *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Trichuris trichiura* y se objetivó una mayor detección de multi-parasitismo por parte de la qPCR que por parte del análisis microscópico, ya que fue mucho más probable que esta técnica detectara dos o más infecciones concurrentes en una muestra dada que la microscopía (con un valor $p < 0,05$). Si atendemos a este hecho del multi-parasitismo, cabe decir que es un factor importante a tener en cuenta a la hora de seleccionar los medicamentos antiparasitarios apropiados y de implementar la administración masiva de los mismos (Mejia y col. 2013). Además, la identificación de pacientes multi-parasitados puede proporcionar información acerca de las consecuencias patológicas que se producen en la interacción entre parásitos filogenéticamente distintos que comparten un mismo nicho anatómico (Mejia y col. 2013).

A su vez, Batra y col., abogan en su estudio de 2016 porque este hecho de no detección de otros parásitos por parte de la PCR podría verse muy reducido si se implementasen algoritmos basados en la información clínica del paciente para poder identificar así factores de riesgos y poder aplicar de tal forma métodos alternativos de diagnóstico (por ejemplo, investigar la eosinofilia para detectar *Strongyloides* o anquilostomiasis) (Batra y col. 2016). En su estudio se concluyó que el diagnóstico de parásitos gastrointestinales basado en BD MaxTM Enteric Parasite Panel y, en general, en paneles moleculares multiplex, podrá ser adaptado cada vez más en la práctica clínica diaria y es una buena alternativa al análisis microscópico, particularmente en pacientes de bajo riesgo (por ejemplo, no viajeros que viven en países industrializados), donde el riesgo de parásitos no detectados por no estar incluidos en el panel de la PCR es limitado (Batra y col. 2016).

PCR y genotipado

No es posible hablar de PCR en Parasitología sin hablar de genotipificación ya que aunque los estudios de genotipado se utilizan con fines epidemiológicos, se describen aquí algunos de los estudios realizados al respecto, ya que las reacciones que se utilizan para ello son las mismas o se encuentran muy relacionadas con las que se utilizan para diagnóstico y porque los estudios de epidemiología molecular dan mucha información acerca de la posibilidad de transmisión del parásito en determinadas poblaciones.

Se han desarrollado métodos basados en la PCR para detectar los diferentes genotipos de *Giardia lamblia* (Soares y col., 2016). En estudios previos, determinados locis genéticos como β -giardina, 18SrRNA (subunidad 18 del ARN ribosómico), *gdh* (glutamato deshidrogenasa), *rRNA* (ARN ribosómico), *ssuRRNA* (ARN ribosómico de subunidad pequeña) *tpi* (trioxa fosfato isomerasa), y *factor de elongación 1- α*, han sido empleados como locis del gen diana en los ensayos de PCR de *Giardia lamblia* (Calderaro y col., 2010; Hawash y col., 2016; Soares y col., 2016). La secuencia del gen del *rRNA* es corta y está muy conservada entre los principales genotipos de *Giardia lamblia*, por lo que se ha utilizado principalmente en ensayos de detección de *Giardia lamblia* por PCR (Hawash y col., 2016). De manera contraria, los otros genes se han utilizado con frecuencia en estudios tanto de detección como de genotipado de *Giardia lamblia* (Hawash y col., 2016). Por ejemplo, el gen *bg* que codifica la proteína β -Giardina ha sido sugerido para identificar el genotipo de *Giardia lamblia* en

aspectos de investigación como son la especificidad del huésped y los patrones de transmisión de la misma (Calderaro y col., 2010).

Estas técnicas de PCR han permitido distinguir 7 genotipos/assemblages diferentes de *Giardia lamblia*, denominados de la A a la G (Calderaro y col., 2010; Hawash y col., 2016). Si bien es cierto que el assemblage E se ha aislado recientemente en heces humanas (Hawash y col., 2016), los assemblages productores de giardiosis en los humanos son el A y el B (Sahagún y col., 2008; Calderaro y col., 2010; Hawash y col., 2016). El assemblage A, al constar de aislamientos, se puede agrupar a su vez en dos grupos diferentes. El grupo A1 está conformado por una mezcla de aislamientos estrechamente relacionados tanto con humanos como con animales, mientras que el grupo A11 únicamente se encuentra conformado por aislamientos humanos. Por otro lado, el assemblage B es un grupo genéticamente diverso en el que predominan los aislamientos humanos, aunque se encuentran también algunos genotipos animales (Sahagún y col., 2008).

La mayoría de los estudios moleculares realizados en España sobre giardiosis identifican al genotipo B como el más frecuentemente aislado en casos humanos (Saura-Carretero y col., 2021). Este hecho ya ha sido descrito en otros países, como son por ejemplo algunos estudios realizados tanto en Italia como en Arabia Saudita Occidental (Calderaro y col., 2010; Hawash y col., 2016). No obstante, cabe destacar el estudio de Calderaro y col., de 2010, en el cual objetivaron que la PCR anidada dirigida al gen de la β -giardina solamente fue capaz de amplificar el ADN de *Giardia lamblia* en el 57,4% (112 muestras) de las 195 muestras analizadas, motivo por el cual los autores concluyeron que no se podían generalizar los resultados obtenidos en lo que respecta al genotipado. Los autores atribuyeron ese hecho a que posiblemente la amplificación tuvo como objetivo una única copia del gen (Calderaro y col., 2010). Por otra parte, estos porcentajes de éxito en la PCR cuando se realizan estudios epidemiológicos, alertan de que esta misma situación se puede dar cuando estas técnicas se utilizan para diagnóstico, por lo que el riesgo de obtención de falsos negativos es alto (Calderaro y col., 2010). A su vez, en ese mismo estudio se informó de que, en los análisis multilocus, ciertos aislamientos podían amplificarse en un locus, pero no en otro; mientras que otros aislamientos podían tener un comportamiento opuesto (Calderaro y col., 2010). Además, en el gen β -giardina puede haber una mayor variabilidad de secuencia, y que la presencia de mutaciones puntuales en la secuencia del cebador de unión puede impedir una correcta amplificación, lo cual sugiere que en el futuro podría realizarse un análisis más exhaustivo mediante el uso de un conjunto de cebadores de unión que sí tengan en cuenta tales desajustes (Calderaro y col., 2010).

Recientemente, se propuso que la distribución de genotipos de *Giardia lamblia* es diferente entre niños y adultos y que los niños menores de 12 años están infectados más comúnmente por el assemblage B, mostrando como síntomas principales el dolor abdominal, la hinchazón y la diarrea (Saura-Carretero y col., 2021). Los assemblages A y B poseen una gran variedad genética entre si, motivo por el cual varios investigadores los han considerado como 2 especies diferentes (Sahagún y col., 2008; Hawash y col., 2016). A día de hoy, existe todavía un debate abierto acerca de la posible correlación entre cada genotipo de *Giardia lamblia* y las manifestaciones clínicas de cada uno de ellos (Calderaro y col., 2010; Hawash y col., 2016). Mientras que algunos investigadores han relacionado una infección más leve con el genotipo A y una infección más grave con el genotipo B, otros investigadores han encontrado que las correlaciones nombradas son insignificantes (Hawash y col., 2016). Ejemplo de ello es el estudio de 2008 de Sahagún y col., en el que los autores encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el tipo de assemblage y la sintomatología de giardiosis en un grupo consistente en niños menores de 5 años. En dicho estudio el assemblage A11 se encontró 81,2% de las giardiosis sintomáticas, mientras que el assemblage B se encontró en el 34,6%, encontrando por lo tanto una correlación entre giardiosis sintomática y assemblage A y entre giardiosis asintomática y assemblage B (Sahagún y col., 2008). A la vista de los resultados se sugiere que en cada assemblage pueden existir distintos factores de virulencia. (Sahagún y col., 2008).

Debido a las diferentes opiniones en cuanto a la relación genotipo-sintomatología, más estudios que aborden este tema son necesarios para poder llegar a conclusiones esclarecedoras.

5.2.4. Perspectivas de futuro

El desarrollo de nuevos métodos diagnósticos es continuo y se encuentra en auge, es por ello que a día de hoy ya se están desarrollando nuevas técnicas de diagnóstico, que, si bien todavía no se encuentran implementadas en todos los laboratorios, podrán tener su lugar en un futuro no muy lejano.

5.2.4.1. Técnicas de secuenciación masiva

Las técnicas de secuenciación masiva se están introduciendo cada vez más en diversos laboratorios, sobre todo para el diagnóstico de pacientes que tienen patologías digestivas crónicas y no se les consigue un diagnóstico.

Estas técnicas se basan en la secuenciación de los nucleótidos que configuran la molécula de ADN, lo cual confiere un análisis más en detalle de su estructura y se convierte en una herramienta eficaz que permite identificar variantes en el material genético (Santamaría-González y col., 2017; López-Causapé y col., 2021). Durante los últimos años se han desarrollado nuevas plataformas de secuenciación de alto rendimiento o de nueva generación (“Next-Generation Sequencing” o NGS), capaces de proporcionar, en un único proceso de secuenciación y de forma paralela y simultánea, millones de fragmentos de ADN, lo que eleva el rendimiento y disminuye el tiempo y el coste del análisis, lo que supone grandes ventajas respecto a los sistemas convencionales (Santamaría-González y col., 2017; López-Causapé y col., 2021). Dichas técnicas pueden presentar dos estrategias en su aplicación a la hora de diagnosticar etiológicamente las enfermedades infecciosas: estrategias de secuenciación dirigida y estrategias no dirigidas o metagenómicas (Santamaría-González y col., 2017; López-Causapé y col., 2021).

Identificar al microorganismo o microorganismos causantes de la infección es fundamental para tratar adecuadamente al paciente. Esta identificación de los microorganismos mediante los métodos convencionales de diagnóstico microbiológico, ya sean directos o indirectos, puede presentar limitaciones tal y como se ha ido comentando en la presente revisión, pudiendo ser herramientas insuficientes para determinar el diagnóstico o demasiado lentas. Es por estas limitaciones que las técnicas basadas en la PCR han sido incorporadas progresivamente en los laboratorios de Microbiología clínica; sin embargo, la PCR, y al igual que los métodos tradicionales de diagnóstico, también presenta la desventaja de requerir una sospecha etiológica del agente causante de la infección, hecho que es diferencial con las nombradas técnicas de secuenciación masiva (Santamaría-González y col., 2017; López-Causapé y col., 2021).

Esta técnica se aplica al estudio de microbiota en general, que puede incluir parásitos como *Giardia*, o al estudio de los genotipos del parásito, siendo capaz de identificar todos los que se encuentren presentes en esa muestra en ese momento. Como desventajas importantes es necesario comentar el alto coste de los equipos necesarios y la complejidad del análisis de los datos. Respecto al coste del análisis, la rentabilidad es alta para los estudios de microbiota donde no se conoce el agente implicado en la patología, pero por el momento el coste es muy alto para análisis de rutina. Son técnicas todavía muy novedosas, con poca experiencia para valorar su utilidad en diagnóstico, pero que tienen grandes posibilidades de futuro (López-Causapé y col., 2021).

6. CONCLUSIONES

1. Por su especificidad, sensibilidad, bajo coste en tiempo y reactivos y porque permiten el diagnóstico de otras parasitosis, las técnicas de microscopía no deben de ser sustituidas por otras técnicas, aunque precisen de personal altamente capacitado.
2. Las técnicas de inmunodiagnóstico proporcionan ventajas en lo que respecta a la capacitación del personal que las realiza y permiten analizar un gran número de muestras simultáneamente. No obstante, la aparición de falsos positivos y negativos los hace más útiles como técnicas de apoyo o para cribado cuando se precisa analizar un gran número de muestras.
3. Las técnicas moleculares presentan una mayor sensibilidad que las microscópicas y el inmunodiagnóstico, pero su mayor coste y dificultad limita su uso en la rutina de laboratorio, haciéndolas más útiles en casos complicados.

4. Cualquiera que sea la técnica de laboratorio utilizada para el diagnóstico de la giardiosis es imprescindible para el profesional de la medicina considerar el antecedente epidemiológico y la clínica acompañante a la hora de decidir la prescripción de un tratamiento.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Addiss DG, Mathews HM, Stewart JM, Wahlquist SP, Williams RM, Finton RJ, Spencer HC, Juranek DD. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for *Giardia lamblia* antigen in stool. *J Clin Microbiol*. 1991;29(6):1137-1142. doi:10.1128/jcm.29.6.1137-1142.1991
- Ahmed NH, Chowdhary A. Comparison of different methods of detection of enteric pathogenic protozoa. *Indian J Med Microbiol*. 2013;31(2):154-160. doi:10.4103/0255-0857.115242
- Akgun S, Celik T. Evaluation of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Cryptosporidium hominis/Cryptosporidium parvum* in human stool samples by the BD MAX™ Enteric Parasite Panel. *Folia Parasitol (Praha)*. 2020;67:2020.020. Published 2020 Aug 7. doi:10.14411/fp.2020.020
- Aldeen WE, Hale D, Robison AJ, Carroll K. Evaluation of a commercially available ELISA assay for detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1995;21(2):77-79. doi:10.1016/0732-8893(94)00142-j
- Banisch DM, El-Badry A, Klinnert JV, Ignatius R, El-Dib N. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica/dispar*, *Giardia duodenalis* and *cryptosporidia* by immunochromatographic assay in stool samples from patients living in the Greater Cairo Region, Egypt. *World J Microbiol Biotechnol*. 2015;31(8):1251-1258. doi:10.1007/s11274-015-1875-5
- Baqai R, Kazmi SU, Zuberi SJ. Dot ELISA for antibody detection in giardiasis. *J Pak Med Assoc*. 1995;45(12):324.
- Batra R, Judd E, Eling J, Newsholme W, Goldenberg SD. Molecular detection of common intestinal parasites: a performance evaluation of the BD Max™ Enteric Parasite Panel. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35(11):1753-1757. doi:10.1007/s10096-016-2722-9
- Behr MA, Kokoskin E, Gyorkos TW, Cédilotte L, Faubert GM, Maclean JD. Laboratory diagnosis for *Giardia lamblia* infection: A comparison of microscopy, coprodiagnosis and serology. *Can J Infect Dis*. 1997;8(1):33-38. doi:10.1155/1997/270179
- Calderaro A, Gorrini C, Montecchini S, Montecchini S, Peruzzi S, Piccolo G, Rossi S, Gargiulo F, Manca N, Dettori G, Chezzi C. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the laboratory diagnosis of giardiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;66(3):261-267. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.10.004
- Chaudhuri PP, Das P, Bhattacharya SK, Bhattacharya MK, Pal SC. Enzyme immunoassay for detection of immunoglobulin M antibodies to *Giardia lamblia*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1991;10(6):534-536. doi:10.1007/BF01963949
- Díaz Carbonell JV, Fernández-Alonso Borrajo ME. Giardiasis: una breve revisión. Perspectivas diagnósticas en el laboratorio clínico [Giardiasis: a brief review. The diagnostic prospects in the clinical laboratory]. *An Esp Pediatr*. 1996;44(2):87-91.
- Dutt P, Mehta S, Vinayak VK. Enzyme-linked immunosorbent assay for copro-diagnosis of giardiasis and characterisation of a specific *Giardia lamblia* antigen in stools. *J Med Microbiol*. 1991;34(5):271-275. doi:10.1099/00222615-34-5-271
- El-Nahas HA, Salem DA, El-Henawy AA, El-Nimr HI, Abdel-Ghaffar HA, El-Meadawy AM. *Giardia* diagnostic methods in human fecal samples: a comparative study. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013;84(1):44-49. doi:10.1002/cyto.b.21048
- Elkadi IA, Smith DH, Hommel M. Early diagnosis of giardiasis by faecal antigens detection using capture ELISA in a cohort of children in the United Arab Emirates. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1992;86(5):520-521. doi:10.1016/0035-9203(92)90094-s

Elsafi SH, Al-Maqati TN, Hussein MI, Adam AA, Hassan MM, Al Zahrani EM. Comparison of microscopy, rapid immunoassay, and molecular techniques for the detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol Res.* 2013;112(4):1641-1646. doi:10.1007/s00436-013-3319-1

Gaafar MR. Evaluation of enzyme immunoassay techniques for diagnosis of the most common intestinal protozoa in fecal samples. *Int J Infect Dis.* 2011;15(8):e541-e544. doi:10.1016/j.ijid.2011.04.004

Garcia LS, Shimizu RY, Novak S, Carroll M, Chan F. Commercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography. *J Clin Microbiol.* 2003;41(1):209-212. doi:10.1128/JCM.41.1.209-212.2003

García-Bujalance S, García-Gil V, Baquero-Artigao F. Diagnóstico microbiológico de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia intestinalis* en pediatría [Microbiological diagnosis of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia intestinalis* in paediatrics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(3):193-194. doi:10.1016/j.eimc.2012.04.005

Goldin AJ, Apt W, Aguilera X, Zulantay I, Warhurst DC, Miles MA. A capture ELISA detects *Giardia lamblia* antigens in formalin-treated faecal samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992;86(2):164-165. doi:10.1016/0035-9203(92)90552-n

Gotfred-Rasmussen H, Lund M, Enemark HL, Erlandsen M, Petersen E. Comparison of sensitivity and specificity of 4 methods for detection of *Giardia duodenalis* in feces: immunofluorescence and PCR are superior to microscopy of concentrated iodine-stained samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;84(3):187-190. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.11.005

Gutiérrez-Cisneros MJ, Martínez-Ruiz R, Subirats M, Merino FJ, Millán R, Fuentes I. Evaluación de dos métodos inmunocromatográficos comerciales para el diagnóstico rápido de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. en muestras de heces [Assessment of two commercially available immunochromatographic assays for a rapid diagnosis of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal specimens]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(3):201-203. doi:10.1016/j.eimc.2010.09.005

Hanson KL, Cartwright CP. Use of an enzyme immunoassay does not eliminate the need to analyze multiple stool specimens for sensitive detection of *Giardia lamblia*. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):474-477. doi:10.1128/JCM.39.2.474-477.2001

Hawash Y, Ghonaim MM, Al-Shehri SS. An Improved PCR-RFLP Assay for Detection and Genotyping of Asymptomatic *Giardia lamblia* Infection in a Resource-Poor Setting. *Korean J Parasitol.* 2016;54(1):1-8. doi:10.3347/kjp.2016.54.1.1

Jahan N, Khatoon R, Ahmad S. A Comparison of Microscopy and Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of *Giardia lamblia* in Human Faecal Specimens. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(11):DC04-DC6. doi:10.7860/JCDR/2014/9484.5087

Janoff EN, Craft JC, Pickering LK, Novotny T, Blaser MJ, Knisley CV, Reller LB. Diagnosis of *Giardia lamblia* infections by detection of parasite-specific antigens. *J Clin Microbiol.* 1989;27(3):431-435. doi:10.1128/jcm.27.3.431-435.1989

Korzeniewski K, Konior M, Augustynowicz A, Lass A, Kowalska E. Detection of *Giardia intestinalis* infections in Polish soldiers deployed to Afghanistan. *Int Marit Health.* 2016;67(4):243-247. doi:10.5603/IMH.2016.0043

Laude A, Valot S, Desoubeaux G, Argy N, Nourrisson C, Pomares C, Machouart M, Le Govic Y, Dalle F, Botterel F, Bourgeois N, Cateau E, Leterrier M, Le Pape P, Morio F. Is real-time PCR-based diagnosis similar in performance to routine parasitological examination for the identification of *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum/Cryptosporidium hominis* and *Entamoeba histolytica* from stool samples? Evaluation of a new commercial multiplex PCR assay and literature review. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(2):190.e1-190.e8. doi:10.1016/j.cmi.2015.10.019

López-Causapé C, González-Candelas F, Tomás-Carmona M, Oliver-Palomo A. Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2021; 71. ISBN: 978-84-09-31350-1

Mank TG, Zaaij 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(8):615-619. doi:10.1007/BF02447929

Mejia R, Vicuña Y, Broncano N, Sandoval C, Vaca M, Chico M, Cooper PJ, Nutman TB. A novel, multi-parallel, real-time polymerase chain reaction approach for eight gastrointestinal parasites provides improved diagnostic capabilities to resource-limited at-risk populations. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;88(6):1041-1047. doi:10.4269/ajtmh.12-0726

Nazeer JT, El Sayed Khalifa K, von Thien H, El-Sibaei MM, Abdel-Hamid MY, Samir-Tawfik RA, Tannich E. Use of multiplex real-time PCR for detection of common diarrhea causing protozoan parasites in Egypt. *Parasitol Res.* 2013;112(2):595-601. doi:10.1007/s00436-012-3171-8

Nguyen TK, Kherouf H, Blanc-Pattin V, Allais E, Chevalier Y, Richez A, Ramade C, Peyron F. Evaluation of an immunochromatographic assay: *Giardia-Strip®* (Coris BioConcept) for detection of *Giardia intestinalis* in human fecal specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(4):623-625. doi:10.1007/s10096-011-1332-9

Ros MJ, Reina J. Experiencia con un método de inmunofluorescencia directa para la detección de quistes de *Giardia lamblia* en heces [Experience with a direct immunofluorescence method for detecting *Giardia lamblia* cysts in feces]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1995;13(8):496-497.

Rosenblatt JE, Sloan LM, Schneider SK. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in stool specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1993;16(4):337-341. doi:10.1016/0732-8893(93)90086-m

Sadaka HA, Gaafar MR, Mady RF, Hezema NN. Evaluation of ImmunoCard STAT test and ELISA versus light microscopy in diagnosis of giardiasis and cryptosporidiosis. *Parasitol Res.* 2015;114(8):2853-2863. doi:10.1007/s00436-015-4486-z

Sahagún J, Clavel A, Goñi P, Seral C, Llorente MT, Castillo FJ, Capilla S, Arias A, Gómez-Lus R. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008;27(1):81-83. doi:10.1007/s10096-007-0404-3

Santamaría-González M, Lezana-Rosales JM. Técnicas de secuenciación masiva (NGS). Aplicaciones clínicas de las técnicas actuales de Biología Molecular. 2017; Ed. Cont. Lab. Clin 37: 33-40. ISBN 978-84-697-4013-2

Saura-Carretero Z, Villanueva-Alarcón M, Pérez-Olaso O, Aleixandre-Górriz I, Real-Fernández A, Sánchez-Thevenet P, Gregori-Roig P. Giardiosis en población pediátrica de la provincia de Castellón: clínica e impacto [Giardiasis in a paediatric population of the province of castellon. Clinical details and impact]. *An Pediatr (Engl Ed).* 2021;94(5):278-284. doi:10.1016/j.anpedi.2020.06.023

Schunk M, Jelinek T, Wetzel K, Nothdurft HD. Detection of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* in stool samples by two enzyme immunoassays. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001;20(6):389-391. doi:10.1007/pl00011279

Schuurman T, Lankamp P, van Belkum A, Kooistra-Smid M, van Zwet A. Comparison of microscopy, real-time PCR and a rapid immunoassay for the detection of *Giardia lamblia* in human stool specimens. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(12):1186-1191. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01836.x

Silva RK, Pacheco FT, Martins AS, Menezes JF, Costa-Ribeiro H, Ribeiro TC, Mattos AP, Oliveira RR, Soares NM, Teixeira MC. Performance of microscopy and ELISA for diagnosing *Giardia duodenalis* infection in different pediatric groups. *Parasitol Int.* 2016;65(6 Pt A):635-640. doi:10.1016/j.parint.2016.08.012

Soares R, Tasca T. Giardiasis: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. *J Microbiol Methods.* 2016;129:98-102. doi:10.1016/j.mimet.2016.08.017

Stark D, Al-Qassab SE, Barratt JL, Stanley K, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis JT.. Evaluation of multiplex tandem real-time PCR for detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in clinical stool samples. *J Clin Microbiol.* 2011;49(1):257-262. doi:10.1128/JCM.01796-10

ten Hove R, Schuurman T, Kooistra M, Möller L, van Lieshout L, Verweij JJ. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(10):1001-1007. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01788.x

ten Hove RJ, van Esbroeck M, Vervoort T, van den Ende J, van Lieshout L, Verweij JJ. Molecular diagnostics of intestinal parasites in returning travellers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28(9):1045-1053. doi:10.1007/s10096-009-0745-1

Ungar BL, Yolken RH, Nash TE, Quinn TC. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. *J Infect Dis.* 1984;149(1):90-97. doi:10.1093/infdis/149.1.90

Van den Bossche D, Cnops L, Verschueren J, Van Esbroeck M. Comparison of four rapid diagnostic tests, ELISA, microscopy and PCR for the detection of *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba histolytica* in feces. *J Microbiol Methods.* 2015;110:78-84. doi:10.1016/j.mimet.2015.01.016

Van Lint P, Rossen JW, Vermeiren S, Ver Elst K, Weekx, S, Van Schaeren J, Jeurissen A. Detection of *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba histolytica* in clinical stool samples by using multiplex real-time PCR after automated DNA isolation. *Acta Clin Belg.* 2013;68(3):188-192. doi:10.2143/ACB.3170

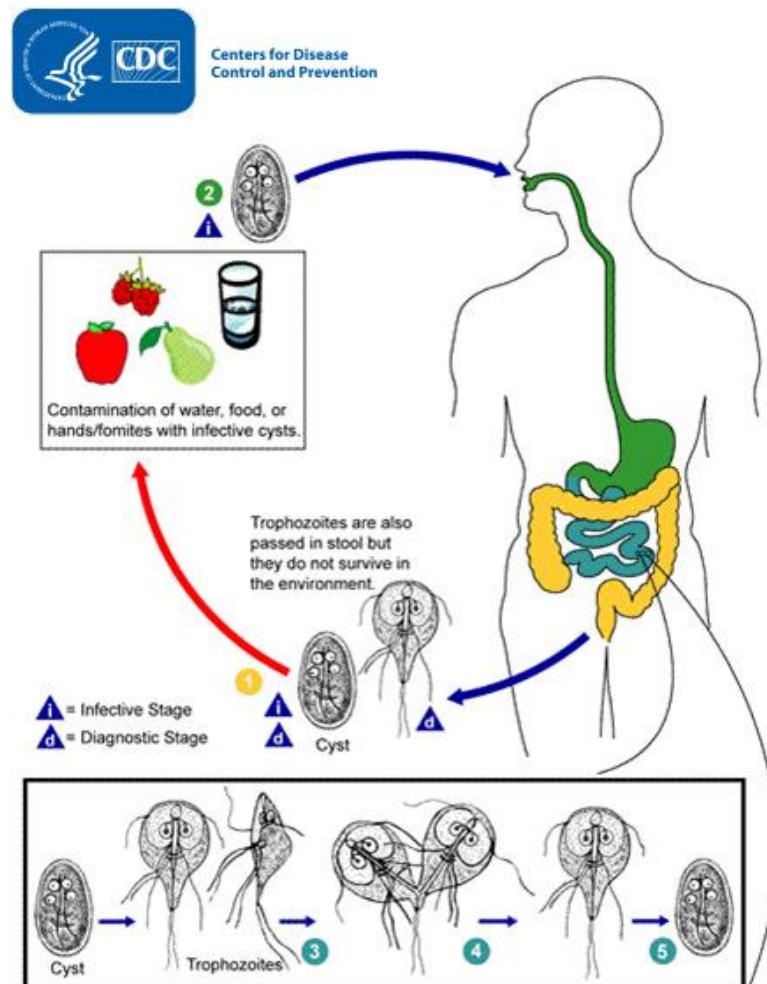
Verweij JJ, Schinkel J, Laeijendecker D, van Rooyen MA, van Lieshout L, Polderman AM. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Mol Cell Probes.* 2003;17(5):223-225. doi:10.1016/s0890-8508(03)00057-4

Vidal AM, Catapani WR. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. *Sao Paulo Med J.* 2005;123(6):282-285. doi:10.1590/s1516-31802005000600006

Winiecka-Krusnell J, Linder E. Detection of *Giardia lamblia* cysts in stool samples by immunofluorescence using monoclonal antibody. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1995;14(3):218-222. doi:10.1007/BF02310359

8. ANEXOS

Anexo I. Ciclo vital de *Giardia lamblia*



Anexo I. Ciclo vital de *Giardia lamblia* (<https://www.cdc.gov/parasites/giardia/pathogen.html>).

Anexo II. Tabla 2. Comparativa entre los diagnósticos microscópico e inmunoenzimático

Estudio	Objetivo	Estándar de referencia	Sensibilidad	Especificidad	Características EIA	Características microscopía
Ungar y col., 1984	ELISA vs Micros 167 pacientes, 167 muestras	Micros 1 m	ELISA: 92%	ELISA: 98%	Ahorro de tiempo y € < m, sencillo > detección en asintomáticos Monitoriza respuesta al tto Limitación si m almacenadas en alcohol polivinílico o formalina; 2 FN; No + parásitos	+ parásitos FN Intervalo de tiempo de recolección afecta a los resultados
Janoff y col., 1989	Micros vs ELISA y CIEF en población de centro de cuidado infantil 239 pacientes, 239 muestras	Micros 1 m	Micros: 100% ELISA: 94%	Micros: 100% ELISA: 95%	> S, > muestras, ↓ tiempo, ↓ €, ↓ carga de trabajo, fácil interpretación de resultados	+ parásitos
	Microscopía VS ELISA y CIEF en población adulta 118 pacientes (86 con diarrea y 12 sanos), 118 muestras	Micros 1 m	Micros: 100% ELISA: 94%	Micros: 100% ELISA: 91%	< E, no + parásitos, FP, 2FN, RC	
Goldin y col., 1991	Micros vs ELISA en suspensión de solución salina tamponada con fosfato 161 niños chilenos, 161 muestras	Micros 1 m	Micros: 95% ELISA: 95%	Micros: 84% ELISA: 82%	> E	
	Micros vs ELISA en suspensión conservadas en formalina 161 niños chilenos, 161 muestras		Micros: 95% ELISA: 94%	Micros: 91% ELISA: 88%	> Eficacia con heces en formalina Aplicable a estudios epidemiológicos, < E, FP por RC	FN
Dutt y col., 1991	Micros vs ELISA y CIEP en detección de GSLA 92 pacientes, 92 muestras	Micros 1 muestra	ELISA: 100%		Buena S y E Detecta GSLA en micros neg > detección GSLA que CEIP	
Rosenblatt y col., 1993	Micros vs ELISA 342 muestras	Micros 1 muestra	ELISA: 97%	ELISA: 96%	Flexibilidad en m, rápida, sencilla, precisa € total < No personal entrenado	+ parásitos 7 posibles FN

Abreviaciones: Micros, microscopía; CIEF, inmunoelectroforesis a contracorriente; m, muestra/muestras; €, costo, precio; <, menos; >, mayor; + parásitos, detecta otros parásitos además de *Giardia lamblia*; FN, falsos negativos; FP, falsos positivos; ↓, disminuye; S, sensibilidad; E, especificidad; GSLA, Antígeno específico de *Giardia*; RC, reactividad cruzada

Estudio	Objetivo	Estándar de referencia	Sensibilidad	Especificidad	Características EIA	Características microscopía	
Aldeen y col., 1995	Micros vs ProspecT/ <i>Giardia</i> ELISA vs FDA	-ELISA pos y Micros pos o DFA pos -ELISA pos en 2 o más m -Micros pos	ELISA: 91% Micros y DFA: 55%	ELISA: 98% Micros y DFA: 100%	> S, < tiempo, rápida, < €, costo-efectiva No + parásitos, 7 FP	+ parásitos 10 FN > tiempo > €	
Mank y col., 1997	Micros 1 m vs ProspecT/ <i>Giardia</i> ELISA 1 m vs Celisa (ELISA) 1 m	366 pacientes con diarrea de 1 semana, 366 muestras	Micros 1 m	ProspecT/ <i>Giardia</i> ELISA: 100% Celisa (ELISA): 95,5%	ProspecT/ <i>Giardia</i> ELISA: 97,8% Celisa (ELISA): 98,1%	Detectó 7 casos extra No FP No + parásitos	+ parásitos No FP 5 FN
	Micros 2 m vs ProspecT/ <i>Giardia</i> ELISA 1 m vs Celisa (ELISA) 1 m		Micros 2 m	ProspecT/ <i>Giardia</i> ELISA: 92,5% Celisa [®] (ELISA): 86,8%	ProspecT/ <i>Giardia</i> ELISA: 99,4% Celisa (ELISA): 99,4%	Detectó 2 casos extras No FP 4 FN No + parásitos	+ parásitos No FP 2 FN
	Micros 2 m vs ProspecT/ <i>Giardia</i> ELISA 2 m vs Celisa (ELISA) 2 m		Micros 2 m + ProspecT/ <i>Giardia</i> ELISA 2 m + Celisa (ELISA) 2 m	Micros 1m: 80% ProspecT/ <i>Giardia</i> ELISA 1m: 92,7% Celisa (ELISA) 1m: 87,3%	Micros 2m: 96,4% ProspecT/ <i>Giardia</i> ELISA 2m: 100% Celisa (ELISA) 2m: 98,2%		> S en 1 m No FP No + parásitos
Hanson y col., 2001	Microscvs ProspecT/ <i>Giardia</i> ELISA 103 pacientes, 206 muestras	-Micros pos y EIA pos o neg -Micros neg y EIA pos y al repetir: -Micros pos -EIA pos -Síntomas y tto giardiosis	Micros 1 muestra: 66,7% Micros 2 muestras: 93,3% EIA 1 muestra: 80% EIA 2 muestras: 96,3%	EIA: 98,7%	> S, usar 1 m donde prev de otros parásitos sea apox. 0 2 FP 1 m no es mejor que 2 m de micros Si prev de otros parásitos es alta se requieren 2 m	Baja S si 1 m	
Schunk y col., 2001	RIDASCREEN [®] vs micros 276 muestras de pacientes con diarrea y otra sintomatología	Micros 1 m	RIDASCREEN [®] : 100%	RIDASCREEN [®] : 99,6%	Incrementa efectividad diagnóstica, no + parásitos	+ parásitos	

Abreviaciones: Micros, microscopía; DFA, anticuerpo fluorescente directo; pos, positivo/a; neg, negativo/a; m, muestra/muestras; €, costo, precio; <, menos; >, mayor; + parásitos, detecta otros parásitos además de *Giardia lamblia*; FN, falsos negativos; FP, falsos positivos; ↓, disminuye; S, sensibilidad; E, especificidad; prev, prevalencia

Estudio	Objetivo	Estándar de referencia	Sensibilidad	Especificidad	Características EIA	Características microscopía
Vidal y col., 2005	Micros vs ELISA en 1 m 142 pacientes, 142 muestras				Rápida, fácil uso, > m a la vez, > S y E en 1 m, no + parásitos, Elevado €, detecta carga parasitaria baja, útil en estudios epidemiológicos	< € + parásitos Debe realizarse en heces frescas
Gaafar 2011	Triage EIA (EIA para <i>Giardia lamblia</i> , <i>Cryptosporidium</i> spp y <i>Entamoeba histolytica</i>) vs micros 100 m de pacientes con síntomas GI, principalmente diarrea	Micro 1 m	Triage EIA: 100%*	Triage EIA: 95,3%*	Simple Entrenamiento mínimo Rápido Flexibilidad en muestras Detección simultánea	4 FP + económico Requiere habilidad del personal
Jahan y col., 2014	RIDASCREEN® vs micros 1.680 pacientes con diarrea y otra sintomatología GI, 5.040 muestras	Micros	RIDASCREEN®: 100%	RIDASCREEN®: 91,5%	Sencilla, < tiempo, > m a la vez Permite diagnóstico precoz	
Korzeniewski y col., 2016	Microscopía (2 métodos y 3 m de cada soldado), Rida®Quick (IC) y RIDASCREEN® (ELISA) 630 soldados destinados en Afganistán: - IC: 1m (630 m) - ELISA: 1m (630 m) - Microscopía: 3m (1890 m)	Pos en al menos 1 de los 3 métodos	Microsc: 14,9% IC: 5,3% ELISA: 100%	Micros: 100% IC: 100% ELISA: 100%	> S en 1 m Útil como screening en condiciones ambientales adversas	2-4 semanas hasta realizar análisis: posible subestimación de la prevalencia
Silva y col., 2016	ELISA vs micros (Si resultados discordantes, comparación con PCR) 824 niños < 10 años, 824 m	Micros 1 m Combinación de métodos con 1 m			> S en 1 m > m a la vez No experiencia	> € 3 FN 20 FP

Abreviaciones: Micros, microscopía; IC, inmunocromatografía; pos, positivo/a; m, muestra/muestras; €, costo, precio; <, menos; >, mayor; + parásitos, detecta otros parásitos además de *Giardia lamblia*; FN, falsos negativos; FP, falsos positivos; S, sensibilidad; E, especificidad; +, más; GI, gastrointestinal/es

*Valores calculados, no proporcionados por los estudios

Anexo III. Tabla 3. Comparativa entre los diagnósticos microscópico e inmunocromatográfica

Estudio	Objetivo	Estándar de referencia	Sensibilidad	Especificidad	Características IC		Características Microscopía
Garcia y col., 2003	ImmunoCard STAT!® <i>Cryptosporidium/Giardia</i> vs micros 401 muestras	Mircos o inmunoensayo de Ac fluorescentes	ImmunoCard STAT!®: 93,5%	ImmunoCard STAT!®: 100%	< € mano de obra Útil en brotes		+ parásitos
Schuurman y col., 2007	RT-PCR vs micros e ImmunoCard STAT!® 200 muestras	2/3	Micros: 99% ImmunoCard STAT!®: 98%	Micros: 97% ImmunoCard STAT!®: 100%	S elevada, >E, rápido, sencillo, dx de rutina, buen rendimiento 2 FN, no + parásitos		+ parásitos 3 FP, 1 FN
Gutiérrez-Cisneros y col., 2011	Crypto-Giardia (CerTest Biotec) y Strick Crypto-Giardia (Operon) vs micros 254 m de pacientes con diarrea	PCR	CerTest: 97% Operon: 97% Microscopía: 100%	CerTest: 100% Operon: 95% Microscopía: 100%	Alta S y E, fáciles, rápidos, útil en brotes, no personal experiencia, no equipos especiales		> fiabilidad en resultados dudosos Requiere personal experto > tiempo
					CerTest: alta E, no requiere confirmación de resultados 2 FN	Operon: 2 FN 10 FP Confirmar resultados por PCR	
Nguyen y col., 2012	<i>Giardia</i> -Strip® vs Micros 214 pacientes, 359 muestras	Concordancia entre las 2 técnicas Si discrepancias: repetir Si discrepancias: PCR	<i>Giardia</i> -Strip®: 96,2% Micros: 96,5%	<i>Giardia</i> -Strip®: 97,7% Micros: 100%	Simple, rápido, monitoriza tto, fácil de leer incluso con cargas parasitarias bajas 3 FN, 3 FP, no + parásitos		+ parásitos 3 FN
Elsafi y col., 2013	Micros vs. ImmunoCard STAT!® y RT-PCR 148 m de adolescentes con diarrea	2/3	Micros: 85,7% ImmunoCard STAT!®: 95,2%	Micros: 100% ImmunoCard STAT!®: 99,2%	> S, simple, ahorra tiempo, detección rápida, no requiere personal capacitado 1 FN, 2 FP		3 FN
Banisch y col., 2015	RIDA® QUICK vs Micros 104 pacientes con síntomas GI o inespecíficos, 104 muestras	Micros	RIDA® QUICK: 91,9% (Fabricante)	RIDA® QUICK: 99,5% (Fabricante)	Rápido, fácil, no tecnología avanzada, No personal experimentado, Útil en estudio de campo; > €		Baja S en áreas endémicas No detectó <i>Giardia</i>

Abreviaciones: Micros, microscopía; RT-PCR, real-time PCR; m, muestra/muestras; 2/3, coincidencia de los resultados de, al menos, 2 de las 3 pruebas empleadas; €, costo, precio; <, menos; >, mayor; + parásitos, detecta otros parásitos además de *Giardia lamblia*; FN, falsos negativos; FP, falsos positivos; S, sensibilidad; E, especificidad; GI, gastrointestinal/es; tto, tratamiento

Estudio	Objetivo	Estándar de referencia	Sensibilidad	Especificidad	Características IC	Características Microscopía
Sadaka y col., 2015	ImmunoCard STAT!® <i>Cryptosporidium/Giardia</i> y ELISA vs micros 90 m de pacientes con diarrea y síntomas GI	Micros	ImmunoCard STAT!®: 100%	ImmunoCard STAT!®: 94,87%	Rápido, ahorro € en mano de obra, menos pasos que ELISA, fácil de leer, no necesita experto, > detección, no FN 4 FP, < E, > € de kit	< € Personal experto > tiempo
Van den Bossche y col., 2015	4 PDR -ImmunoCardSTAT!®CGE - <i>Crypto/Giardia</i> Duo-Strip® -RIDA®QUICK - <i>Giardia/Cryptosporidium</i> Quick Chek® vs micros y PCR vs ELISA 70 muestras	PCR o concordancia entre ELISA y micros	ImmunoCardSTAT!®CGE: 79,3% <i>Crypto/Giardia</i> Duo-Strip®: 65,5% RIDA®QUICK: 83,3% <i>Giardia/Cryptosporidium</i> Quick Check®: 100% Microscopía: 90%	ImmunoCardSTAT!®CGE: 100% <i>Crypto/Giardia</i> Duo-Strip®: 100% RIDA®QUICK: 100% <i>Giardia/Cryptosporidium</i> Quick Check®: 93,8% Microscopía: 100%	Buena correlación con micros (excepto <i>Crypto/Giardia</i> Duo-Strip®), fácil uso, rápido > € <i>Giardia/Cryptosporidium</i> Quick Check®: 1 FP	+ parásitos > tiempo
Korzeniewski y col., 2016	Microscopía (2 métodos y 3 m por soldado) vs RIDA®QUICK y RIDASCREEN® 630 soldados destinados en Afganistán: - IC: 1m (630 m) - ELISA: 1m (630 m) - Micros: 3m (1890 m)	Se consideró pos si resultado pos en 1 de los 3 métodos empleados	RIDA®QUICK: 5,3% Micros: 14,9%	RIDA®QUICK: 100% Micros: 100%		< € + parásitos

Abreviaciones: Micros, microscopía; PDR, pruebas de diagnóstico rápido; IC, inmunocromatografía; m, muestra/muestras; pos, positivo; E, especificidad €; costo, precio; >, mayor; + parásitos, detecta otros parásitos además de *Giardia lamblia*; FN, falsos negativos; FP, falsos positivos; GI, gastrointestinal/es

Anexo IV. Tabla 4. Comparativa entre los diagnósticos microscópico y PCR

Estudio	Objetivo	Estándar de referencia	Sensibilidad	Especificidad	Características PCR	Características microscopía
Verweij y col., 2003	RT-PCR vs micros vs Alexon (ELISA) 138 muestras, 138 pacientes	Micros	RT-PCR: 98,1%	> S Requiere menos muestras 2 FN		
		2/3	RT-PCR: 98,1% Micros: 89%			
ten Hove y col., 2007	PCR multiplex vs micros 1.863 pacientes, 1.863 muestras				> detección, No inhibición, no + parásitos; 1 FN	+ parásitos
Schuurman y col., 2007	RT-PCR vs. Micros e IC 200 muestras	2/3	Micros: 99% RT-PCR: 100%	Micros: 97% RT-PCR: 92%	> S 8 FP (posible CR)	+ parásitos 3 FP, 1 FN
ten Hove y col., 2009	RT-PCR vs. Micros y ELISA 2.591 muestras de pacientes atendidos en clínica de viajeros		Micros: 60,9%* ELISA: 77,6%* RT-PCR: 93,6%*		> S, > aplicación a viajeros, no inhibición 2 FN	+ parásitos
Calderaro y col., 2010	PCR vs. Micros, IFD e IC 771 muestras, 386 pacientes sospecha parasitosis intestinal	2/3 (Micros, IFD o IC)	PCR: 100% Micros, IFD e IC: 100%	PCR: 100% Micros, IFD e IC: 86,7%	Sensible, > E, > rapidez, rentable, útil en muchas muestras	+ parásitos
Stark y col., 2011	PCR multiplex vs. RT-PCR y Micros 472 muestras	2/3	Micros: 50% RT-PCR: 100% PCR multiplex: 100%	Micros: 100% RT-PCR: 100% PCR multiplex: 100%	> S, Automatiza el proceso Hardware < €, rápida, > rentabilidad	14 FN
Nazeer y col., 2013	RT-PCR multiplex- vs. Micros Estudio casos-controles 396 m de pacientes con diarrea (casos) y 202 m de pacientes sanos (controles)	RT-PCR multiplex	Micros: 57,8%	Micros: 85,5%	>S, eficaz, ↓€, ↓tratamiento innecesario	36 FP 62 FN
Van Lint y col., 2013	PCR multiplex-tr vs. Micros --> Si discrepancias: PCR externa 631 muestras fecales --> 613 por inhibición	2/3	Micros: 61,7% RT-PCR multiplex: 100%	Micros: 100% RT-PCR multiplex: 100%	> S Inhibición de 18 muestras	+ parásitos 18 FN
Elsafi y col., 2013	Microsc vs. ImmunoCard STAT! (IC) y RT-PCR 148 m adolescentes con diarrea	2/3	Micros: 85,7% RT-PCR: 100%	Micros: 100% RT-PCR: 98,4%	> S 1 FP	> E 3 FN

Abreviaciones: Micros, microscopía; RT-PCR, real-time PCR; IC, inmunoensayo; IFD, inmunofluorescencia directa; 2/3, coincidencia de los resultados de, al menos, 2 de las 3 pruebas empleadas; m, muestra/muestras; €, costo, precio; <, menos; >, mayor; + parásitos, detecta otros parásitos además de *Giardia lamblia*; FN, falsos negativos; FP, falsos positivos; S, sensibilidad; E, especificidad; CR, contaminación cruzada

*Valores calculados, no proporcionados por los estudios.

Estudio	Objetivo	Estándar de referencia	Sensibilidad	Especificidad	Características PCR	Características microscopía
Mejia y col., 2013	PCR cuantitativa multiparalela vs. Micros 400 m de niños asintomáticos menores de 13 meses	Micros			> S y E > + parásitos < € > flexibilidad en las muestras	
Hawash y col., 2016	PCR-RFLP vs IC y PCR de referencia	Micros, IC y PCR (91 muestras)	PCR-RFLP: 93,4%	PCR-RFLP: 100%	Simple Sensible Relativamente económico	+ parásitos
	563 muestras: -91 como control -472 restantes	472 muestras	% de concordancia positivo -Micros: 60,7% -IC: 85,7% -PCR: 96,5%	% de concordancia negativo -Micros: 100% -IC: 99,7% -PCR: 100%	3 FN	
Laude y col., 2016	PCR multiplex vs. Micros --> si discrepancias: PCR externa 185 muestras, 185 pacientes	Micros	PCR multiplex: 95%	PCR multiplex: 93%	> S, ↓tiempo	+ parásitos
		2/3	PCR multiplex: 98%		3 FN, 1 inhibición	+ parásitos; 3 FN
Gotfred-Rasmussen y col., 2016	Micros con FAE vs SFF vs. IF vs. RT-PCR 455 muestras	IF	RT-PCR: 91%	RT-PCR: 95,1%	> detección, > S, rápida	Detecta todos los parásitos simultáneamente
		RT-PCR	IF: 50% FAE: 31% FSS: 67%	IF: 99,5% FAE: 100% FSS: 100%	> detección, > S, rápida Tasa de FP: 50%, < E, sugiere verificar resultados pos	
Batra y col., 2016	PCR completamente automatizada (EPP) vs. Micros--> si discrepancias: PCR externa 275 muestras	2/3	EPP: 100% Micros: 88,2%	EPP: 100% Micros: 99,58%	> S < tiempo	+ parásitos 1 FP 4 FN
Akgün y col., 2020	Micros vs BD MAX™ Enteric Parasite Panel 362 pacientes con síntomas GI 362 muestras				Diferencia entre detección de micros y BD MAX™ Enteric Parasite Panel p>0,05	

Abreviaciones: Micros, microscopía; RT-PCR, real-time PCR; IC, inmunoensayo; IF, inmunofluorescencia; FAE, formol-acetato de etilo; FSS, flotación en sal y azúcar; 2/3, coincidencia de los resultados de, al menos, 2 de las 3 pruebas empleadas; m, muestra/muestras; €, costo, precio; <, menos; >, mayor; + parásitos, detecta otros parásitos además de *Giardia lamblia*; FN, falsos negativos; FP, falsos positivos; S, sensibilidad; E, especificidad; pos, positivo/s