

## De sensitiviteit van microscopie versus enzym immuno assay bij de laboratoriumdiagnose van giardiasis

Th. G. MANK<sup>1</sup>, J.M. van ALPHEN-JAGER<sup>2</sup>

Microscopisch onderzoek ter opsporing van darm-parasieten in fecaal materiaal is tijdrovend en vereist getrainde en ervaren analisten. In een onderzoek naar de waarde van ELISA-technieken voor de detectie van *Giardia lamblia* (de meest frequent voorkomende pathogene darmprotozo) werd nagegaan wat de consequentie zou zijn van het achterwege laten van het microscopisch onderzoek.

366 Patiënten die hun huisarts consulteerden in verband met persisterende diarree verzamelden en fixeerden hiertoe twee fecesmonsters met een interval van circa 10 dagen.

Naast de in ons laboratorium gebruikelijke procedure voor parasitologisch onderzoek (microscopische beoordeling van het sediment na concentratie en een IJzer Haematoxyline Kinyoun gekleurd preparaat van gefixeerde feces), werden twee commercieel verkrijgbare ELISA-testen uitgevoerd.

De sensitiviteit van het onderzoek met behulp van de ELISA-methode blijkt hoger dan die van microscopisch onderzoek, ongeacht het feit of wordt uitgegaan van één dan wel van twee fecesmonsters. De negatief voorspellende waarde van de GSA-65 ELISA-uitslag, uitgaande van een enkelvoudig faecesmonster, was 99% wanneer het resultaat vergeleken werd met een 'optimale testprocedure', zijnde het gecombineerde testresultaat van alle binnen de studie toegepaste technieken.

Wij concluderen dat ELISA-onderzoek van een enkel fecesmonster de sensitiviteit van microscopisch onderzoek van een fecespaar benadert.

*Trefwoorden: diagnostiek; giardiasis; microscopie; Enzym Immuno Assay*

Ook in Nederland is *Giardia lamblia* de meest frequent voorkomende vertegenwoordiger uit de groep van humane pathogene darmprotozoa. De infectie kan onopgemerkt verlopen, maar ook acute fulminante diarree en chronische diarree met malabsorptie zijn niet zeldzaam. Het voorkomen van *Giardia lamblia* is wereldwijd. De prevalentie is hoger in ontwikkelingslanden dan in ontwikkelde landen en hoger in stedelijke dan in plattelandsgebieden. De protozo wordt

vaker bij kinderen en jong volwassenen dan bij ouderen gevonden. In Nederland bedraagt de prevalentie van *Giardia lamblia* bij patiënten die hun huisarts raadplegen in verband met diarree-klachten 8-12% (1). De diagnose wordt gesteld door middel van microscopisch onderzoek van het al dan niet gekleurde preparaat, eventueel na concentratie, uitgaande van al dan niet gefixeerde faeces.

Excretie van de parasiet is variabel, met als gevolg een geringe sensitiviteit van het onderzoek van een enkelvoudig faecesmonster. Om de sensitiviteit van het onderzoek te vergroten is het gebruikelijk het onderzoek een of meermalen te herhalen met intervallen van een of meer dagen, een kostbare en tijdrovende handelwijze.

Het fixeren van fecesmonsters waardoor detectie van vegetatieve stadia mogelijk wordt, kan eveneens de sensitiviteit van het onderzoek verhogen. Deze benadering, die in de Verenigde Staten gebruikelijk is, wint ook in Europa aan populariteit.

Relatief nieuw is de mogelijkheid tot immunochemische detectie van *Giardia lamblia*-antigeen in feces (2-6). De voordelen van een dergelijke test liggen voor de hand: een minder subjectief resultaat met een naar verwachting hogere sensitiviteit.

Teneinde de waarde van de immunochemische tests voor de diagnostiek van infecties met *Giardia lamblia* te bepalen werd een prospectief onderzoek opgezet, waarbij de voorspellende waarde van microscopisch onderzoek van één of twee fecesmonsters werd vergeleken met die van recent op de markt gebrachte ELISA's, eveneens uitgaande van één of twee fecesmonsters.

### MATERIAAL en METHODEN

Van februari 1994 tot mei 1995 werden fecesmonsters verzameld van die patiënten die zich tot hun huisarts wendden met klachten van diarree die langer dan een week aanhield. Insluiterium was voorts dat de leeftijd moest liggen tussen 0 en 65 jaar.

Deze patiënten verzamelden twee fecesmonsters met een interval van ongeveer 10 dagen. Behalve dat patiënten werd gevraagd een deel van de feces te fixeren, ontvingen zij een uitgebreide vragenlijst betreffende leefomstandigheden, klachtenpatroon en medicatie.

De gefixeerde en ongefixeerde fecesmonsters werden voor microscopisch onderzoek voorbereid zoals elders beschreven (7). Daarnaast werd, uitgaande van gefixeerde feces, een tweetal commercieel verkrijgbare ELISA-testen uitgevoerd (ProSpecT/Giardia

*Laboratorium voor Parasitologie, Stichting Artsenlaboratorium Haarlem/Stichting Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid Kennemerland<sup>1</sup>; Stichting Artsenlaboratorium Haarlem<sup>2</sup>*

Correspondentie: Dr. Th. G. Mank, Wilhelminastraat 43A, 2011 VK Haarlem.

GSA-65 testkit, Alexon Inc., Mountain View, California, USA en the CELISA testkit, Cellabs Diagnostics, Brookvale, NSW, Australia). Alle preparaten werden geanonimiseerd. Twee daartoe opgeleide onderzoekers met ruime ervaring op het gebied van microscopisch fecesonderzoek speurden naar *Giardia lamblia* volgens een standaard procedure (7).

De ELISA's werden uitgevoerd volgens voorschrift. Het eindpunt van de bepaling is een kleurreactie die met behulp van optische apparatuur wordt afgelezen. Aangezien een gouden standaard voor de diagnose van giardiasis ontbreekt werden de resultaten van de indextest (in ons geval de ELISA), uitgevoerd in één (het eerste) fecesmonster, vergeleken met microscopisch onderzoek uitgevoerd op één (het eerste) dan wel twee fecesmonsters. Als optimale testprocedure werd beschouwd het resultaat van de onderzoeksstrategie waarbij twee fecesmonsters zowel microscopisch als immunochemisch werden onderzocht (8). Een patiënt werd geclassificeerd als lijdend aan giardiasis wanneer één van deze onderzoeksmethoden een positief resultaat opleverde. Hierbij wordt ervan uitgegaan dat fout positieve resultaten niet voorkomen, met andere woorden dat de specificiteit van elke test afzonderlijk 100% bedraagt. Bij de vergelijkingen werd gebruik gemaakt van SPSS PC 4.01 statistische software.

## RESULTATEN

366 patiënten met klachten van persisterende diarree leverden tweemaal SAF-gefixeerde ontlasting in, met een tijdsinterval tussen het eerste en tweede monster van gemiddeld 7 dagen (spreiding 3-8 dagen). Geen der patiënten ontving nitro-imidazol derivaten alvorens ook het tweede faecesmonster was verzameld.

Tabel 1 geeft een opsomming van alle patiënten die in willekeurig welk onderzoek een positief resultaat te zien gaven. Dit was het geval bij 55 patiënten. Wanneer de diagnose giardiasis zou worden gesteld indien een der beschreven onderzoeken, hetzij microscopisch hetzij immunochemisch, een positief resultaat te zien gaf (de optimale testprocedure), levert dit in deze groep een prevalentie van 15% op. Gezien het feit dat de testresultaten van beide ELISA-testen goeddeels overeenstemmen beperken wij ons, ten behoeve van de leesbaarheid van het artikel, tot een vergelijking van de resultaten uitgaande van de Prospect *Giardia* GSA-65 testkit (de testresultaten van de CELISA kit worden in de tabellen separaat gepresenteerd).

Microscopisch onderzoek van het eerste, respectievelijk tweede fecesmonster, leverde in 44, respectievelijk 45 gevallen, een positief resultaat op. Wanneer de resultaten van beide monsters werden gecombineerd, werd bij 53 patiënten de diagnose giardiasis gesteld op grond van microscopisch onderzoek (tabel 1). Door behalve naar cysten ook nog te zoeken naar trofozoieten, hetgeen alleen in SAF-gefixeerd materiaal mogelijk is, werden nog 2 additionele infecties ontdekt.

ELISA-resultaten waren voor wat betreft het eerste fecesmonster positief in 51 gevallen en in 49 gevallen

**Tabel 1.** *Giardia lamblia* in gepaarde SAF-gefixeerde fecesmonsters; ELISA en microscopie. (N=366 patiënten)

Diagnostische benadering	Eerste monster	Tweede monster	Aantal geïnfecteerde patiënten
<i>Microscopie</i>			
Cysten	29	27	26
Trofozoieten	2	–	2
Cysten + trofozoieten	13	18	25
Totaal	44	45	53
<i>Copro-immunochemie</i>			
Prospect GSA-65	51	49	55
CELISA	48	49	54

**Tabel 2.** Vergelijking van ELISA met microscopie, beide op het eerste fecesmonster van iedere patiënt (N=366 patiënten)

ELISA	Microscopie		
	Positief	Negatief	
Positief	44 (42)*	7 (6)*	51 (48)*
Negatief	0 (2)*	315 (316)*	315 (318)*
	44	322	366

Sensitiviteit: GSA-65 100%; Cellabs 95,5%. Specificiteit: GSA-65 97,8%; Cellabs 98,1%. Pos. voorsp. waarde GSA-65 86,3%; Cellabs 87,5%. Neg. voorsp. waarde GSA-65 100%; Cellabs 99,4%. \*: de getallen tussen haakjes representeren de resultaten gebruikmakend van de CELISA kit

voor wat betreft het tweede monster. Combinatie van beide fecesmonsters leverde een diagnose op in 55 gevallen.

Wanneer de resultaten van een ELISA op het eerste faecesmonster worden vergeleken met die van microscopisch onderzoek, eveneens op het eerste monster (tabel 2), wordt bij 7 monsters een discordante uitslag gevonden, in die zin dat een positieve ELISA-uitslag gepaard ging met negatieve microscopie.

Uit het oogpunt van efficiency is het interessant om na te gaan of een ELISA op een enkel fecesmonster een betrouwbare vervanger zou kunnen zijn van microscopie op twee achtereenvolgende fecesmonsters. Deze resultaten zijn weergegeven in tabel 3. 49 Patiënten zijn in beide procedures positief. In twee gevallen werd de infectie alleen in de ELISA aangetoond, terwijl vier infecties alleen met de microscoop werden gevonden.

De twee 'fout-positieven' hadden een klachtenpatroon dat min of meer specifiek was voor giardiasis, met een waterige diarree die bij eerste presentatie reeds 7 dagen bestond. De klachten reageerden goed op metronidazol.

Bij de vier 'fout-negatieven' was de microscopie negatief in het eerste monster (het monster waarin ook de ELISA werd uitgevoerd) maar positief in het tweede monster. Ook de ELISA uitgevoerd op het tweede monster was positief.

**Tabel 3.** Vergelijking van de ELISA (éérste monster) met microscopie van twee fecesmonsters per patiënt (N = 366 patiënten).

ELISA	Microscopie		
	Positief	Negatief	
Positief	49 (46)*	2 (2)*	51 (48)*
Negatief	4 (7)*	311 (311)*	315 (318)*
	53	313	366

Sensitiviteit: GSA-65 92,5%; Cellabs 86,8%. Specificiteit: GSA-65 99,4%; Cellabs 99,4%. Pos. voorsp. waarde: GSA-65 96,1%; Cellabs 95,8%. Neg. voorsp. waarde: GSA-65 98,7%; Cellabs 97,8%. \*:de getallen tussen haakjes representeren de resultaten gebruikmakend van de CELISA kit

**Tabel 4.** Aantal fout negatieven, sensitiviteit en negatief voorspellende waarde van de verschillende diagnostische strategieën voor het aantonen van *Giardia lamblia* infecties, vergeleken met de opbrengst gebruikmakend van de optimale methode (microscopie en ELISA van twee fecesmonsters van iedere patiënt, N=366 patiënten).

Diagnostische strategie	Aantal fout negatieven	Sensitiviteit	Negatief Voorspellende Waarde
<i>Microscopie</i>			
Eerste fecesmonster	11	80,0%	96,6%
Tweede fecesmonster	10	81,8%	96,9%
Fecespaar	2	96,4%	99,4%
<i>ELISA</i>			
Eerste fecesmonster; GSA-65	4	92,7%	98,7%
Tweede fecesmonster; GSA-65	6	89,1%	98,1%
Fecespaar; GSA-65	0	100,0%	100,0%
Eerste fecesmonster; CELISA	7	87,3%	97,8%
Tweede fecesmonster; CELISA	6	89,1%	98,1%
Fecespaar; CELISA	1	98,2%	99,7%

Vergeleken met de surrogaat gouden standaard (ELISA zowel als microscopie in twee opeenvolgende fecesmonsters) bedraagt de sensitiviteit van de ELISA op het eerste fecesmonster 92,7%. (voorspellende waarde van een negatieve testuitslag: 98,7%).

Voor de microscopie op twee fecesmonsters (de gangbare procedure) zijn deze getallen 96,4% en 99,4%. Microscopie op een enkelvoudig fecesmonster heeft een sensitiviteit van 80,0% en een negatief voorspellende waarde van 96,6%. Deze resultaten zijn weergegeven in tabel 4.

## Discussie

*Giardia lamblia* is een veel voorkomende pathogene darmprotozo. In ons onderzoek vonden we deze pro-

tozo bij 15 % van de patiënten bij wie de huisarts op grond van persistente diarree fecesonderzoek liet verrichten.

Op grond van het feit dat in onze onderzoekspopulatie (patiënten met persistente diarreeklachten in de huisartspraktijk) bij ongeveer 60% van de protozoaire diarreeën *Giardia lamblia* wordt gevonden, lijkt het rationeel om bij het parasitologisch fecesonderzoek in eerste instantie de aandacht op dit species te richten (9). Een voor *Giardia* specifieke ELISA biedt hiertoe de mogelijkheid. Door uit te gaan van met SAF gefixeerde feces kan, bij negatieve ELISA en aanhoudende klachten, alsnog microscopisch onderzoek naar andere verwekkers (zoals *Dientamoeba fragilis*) worden verricht.

Onderzoeken die tot nu toe op dit gebied zijn verricht, betroffen kleine groepen patiënten en gingen gebukt onder methodologische tekortkomingen. Zo werd als gouden standaard uitgegaan van microscopisch fecesonderzoek dat zich beperkte tot een enkel fecesmonster, of werd de beslissing een ELISA te verrichten genomen op grond van de uitslag van microscopisch onderzoek (2,5,6).

Ons onderzoek is uniek in die zin dat twee SAF-gefixeerde fecesmonsters van elke patiënt werden onderzocht op geblindeerde en gestandaardiseerde wijze, zowel microscopisch als met behulp van een immunochemische methode.

De hier gepresenteerde gegevens tonen aan dat de sensitiviteit van de ELISA, wanneer wordt uitgegaan van enkelvoudig fecesonderzoek, groter is dan die van microscopisch onderzoek. Wij menen bovendien over sterke argumenten te beschikken voor de veronderstelling dat bij tenminste een deel van de patiënten bij wie een positieve ELISA gepaard ging met negatieve microscopie, wel degelijk sprake was van een infectie met *Giardia lamblia*. In enkele van deze gevallen werd bij microscopisch onderzoek van het tweede monster immers wel een *Giardia lamblia* gevonden. In andere gevallen werd de ELISA-uitslag ondersteund door het klinisch beeld en 'ex iuuantibus'. De specificiteit van de ELISA ligt, naar wij op grond van deze overwegingen aannemen, dicht bij 100%. Een nauwkeuriger schatting kan bij het ontbreken van een gouden standaard thans nog niet worden gegeven.

Uitgaande van de 'optimale methode' (bij gebrek aan een gouden standaard) zoals boven beschreven, is de voorspellende waarde van een enkele negatieve ELISA-testuitslag niet veel lager dan die van microscopisch onderzoek van twee fecesmonsters (98,7% vs. 99,4%)

Het zoeken naar trofozoieten levert niet veel additionele diagnoses op. Wel succesvol is het microscopisch onderzoek van het tweede monster. Microscopisch onderzoek van een tweede fecesmonster levert meer additionele diagnoses op dan het verhogen van de sensitiviteit van het onderzoek door het toevoegen van een ELISA aan de onderzoeksprocedure uitgaande van één fecesmonster. Hierbij moet wel worden aangetekend dat het microscopisch onderzoek in het algemeen hogere eisen stelt aan de expertise en de motivatie van analisten dan het ELISA-onderzoek.

Zeker in een groter laboratorium (meer dan 10 aanvragen per dag) is de ELISA minder arbeidsintensief dan de microscopie. Bij een kleiner aantal aanvragen kan de ELISA niet meer dan een of enkele malen per week worden uitgevoerd, hetgeen de 'doctor delay' onnodig vergroot. Overigens moet worden betwijfeld of in een routinelaboratorium met roulerende analisten, dat slechts enkele fecesmonsters aangeboden krijgt, de expertise van meerdere analisten op een kwalitatief goed niveau kan worden gehouden.

### Conclusie

Samenvattend kan worden gesteld dat onder optimale omstandigheden de opbrengst van microscopisch onderzoek van twee fecesmonsters optimaal is.

ELISA-onderzoek van een enkel fecesmonster is een goed en economisch aantrekkelijk alternatief. Microscopisch onderzoek van een enkel fecesmonster is een tamelijk ongevoelige methode voor de detectie van *Giardia lamblia*.

### Literatuur

1. Mank TG, Zaat JOM, Polderman AM. Onderschatting van darmprotozoa als oorzaak van diarree in de huisartspraktijk. *NTvG* 1995; 139: 324-327.
2. Chappell CL, Marson CC. *Giardia lamblia* antigen detection in patients with chronic gastrointestinal disturbances. *Journal of Family Practice* 1992; 35: 49-53.
3. Hopkins RM, Deplazes P, Meloni BP, Reynoldson JA, Thompson RCA. A field and laboratory evaluation of a commercial ELISA for the detection of *Giardia* coproantigens in humans and dogs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1993; 87: 39-41.
4. Addis DG, Mathews HM, Stewart JM, Wahlquist SP, Williams RM, Finton RJ, Spencer HC, et al. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for *Giardia lamblia* antigen in stool. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1137-1142.
5. Rosoff JD, Sanders CA, Sonnad SS, DeLay PR, Hadley WK, Vincenzi FF, Yajko DM, et al. Stool diagnosis of giardiasis using a commercially available enzyme immunoassay to detect *Giardia*-specific antigen 65 (GSA-65). *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1997-2002.
6. Tee GH, Moody AH, Hunt Cooke A, Chiodine PL. Comparison of techniques for detecting antigens of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in faeces. *J Clin Pathol* 1993; 46: 555-558.
7. Mank TG, Zaat JOM, Blotkamp J, Polderman AM. Comparison of fresh versus Sodium Acetate Acetic Acid Formalin preserved stool specimens for diagnosis of intestinal protozoal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 1076-1081.
8. Phelps CA, Hutson A. Estimating diagnostic accuracy using a fuzzy gold standard. *Medical Decision Making* 1995; 15: 44-57.
9. Mank TG, Zaat JOM, Eijk JThM van, Polderman AM, Deelder AM. Persistent diarrhea in a General Practice population in the Netherlands, prevalence of protozoal and other intestinal infections. *Proceedings of the IXth International Congress of Parasitology, Chiba, Japan, 1998* (in press).

### Summary

*The sensitivity of microscopy against enzyme immunoassay in the diagnosis of giardiasis. Mank ThG and Alphen-Jager JM van. Ned Tijdschr Klin Chem 1999; 24: 56-59.*

The microscopic detection and identification of intestinal protozoa in stool samples is time-consuming and should be performed by highly trained and experienced technicians. In this study, the substitution of enzyme immunoassay (EIA) techniques for microscopy as a screening tool for *Giardia lamblia* infections was assessed. Paired stool samples obtained within a ten-day period from 366 patients with persistent diarrhea were examined by microscopy. In addition, two commercially available *Giardia lamblia*-specific EIAs were performed. Compared with microscopy, EIAs for coproantigen detection was more sensitive, based on examination of either one or two stool samples. The negative predictive values of the two EIA's performed on the first stool sample were 98.7% and 97.8%. The results show that EIA for detection of copro-antigens in a single stool sample may be almost as sensitive for identifying giardiasis as repeated microscopy on two sequential stool samples.

*Key-words: diagnostics; giardiasis; microscopy; enzyme immunoassay*