

**Universidad Nacional  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Escuela de Medicina Veterinaria**

**Estudio comparativo de tres métodos tradicionales para el diagnóstico de *Giardia* spp. en caninos, frente a un ELISA de captura como prueba de oro.**

**Modalidad: Tesis de grado**

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

**Karla Carvajal Obando**

**Campus Presbítero Benjamín Nuñez**

**2008**

## **TRIBUNAL EXAMINADOR**

Dr. Jorge Quirós Arce  
Decano

---

Dr. José Alberto Brenes Soto  
Tutor

---

Dr. Juan José Romero Zúñiga  
Cotutor

---

M.S.c. Magaly Caballero Castillo  
Lectora

---

M.S.c. Ana Jiménez R.  
Lectora

---

## **DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se lo dedico a mi madre Jeannette Obando Silva, a mi padre Alexander Carvajal Jiménez y a mi hermana Alexandra Carvajal Obando por todo el apoyo y amor que me dieron durante todos estos años de estudio, sin ustedes no sería quien soy hoy.

Al la Dra. Magaly Caballero Castillo, por ayudarme y guiarme para realizar este trabajo y por ser el ejemplo de profesional que deseo ser.

Al Dr. José Alberto Brenes Soto, por ser quien me motivó para realizar este trabajo, y siempre me apoyó y me ayudó para seguir adelante.

Al Dr. Juan José Romero, por toda su ayuda para que este trabajo fuese mejor y por sus consejos para con éste.

Al Dr. Alexis Berrocal por compartir su talento fotográfico.

Al Dr. Rodolfo Alfaro por transmitirme su conocimiento a través del microscopio.

Agradezco a la Dra. Ana Jiménez por ayudarme con la revisión de este trabajo.

Agradezco a la Dra. Olga Guerrero y a su asistente Dennis Camareno por la ayuda brindada para la realización de este trabajo.

A mis amigos gracias por siempre estar ahí conmigo, por pasar los momentos más difíciles y los más felices junto a mí.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

Pág

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS.....	i
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	ii
ÍNDICE DE CUADROS .....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS .....	v
RESUMEN .....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes .....	1
1.1.1. Giardiasis .....	1
1.1.1.1. Etiología .....	1
1.1.1.2. Presentación .....	2
1.1.1.3. Ciclo biológico .....	3
1.1.1.4. Signos clínicos .....	4
1.1.1.5. Modo de transmisión .....	4
1.1.1.6. Patogénesis en el animal.....	4
1.1.1.7. Diagnóstico laboratorial.....	5
1.1.1.8. Diagnóstico diferencial.....	8
1.1.1.9. Tratamiento y control .....	8
1.2. Justificación .....	10
1.3 Objetivos .....	14
1.3.1 Objetivo General .....	14
1.3.2 Objetivos Específicos .....	14

<b>2. METODOLOGÍA: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Conclusiones.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2. Recomendaciones.....</b>	<b>31</b>
<b>5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>32</b>
<b>6. ANEXOS .....</b>	<b>36</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1:</b> Concordancia: ELISA de captura (IDEXX®) y microscopía directa .....	20
<b>Cuadro 2:</b> Concordancia: ELISA de captura (IDEXX®) y flotación fecal con cloruro de sodio .....	21
<b>Cuadro 3:</b> Concordancia: ELISA de captura (IDEXX®) y tinción con hematoxicilina férrica de Heidenhain.....	22
<b>Cuadro 4:</b> Valores de Se, Sp, Vp+ y Vp- para las técnicas de microscopía directa, flotación fecal con cloruro de sodio y la tinción con Hematoxilina férrica de Heidenhain, tomando como referencia el ELISA de captura (IDEXX®) o prueba de oro.....	23

## **LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS:**

**Ig A:** inmunoglobulina A

**ELISA:** Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas

**spp:** especie

**kg:** kilogramo

**mg:** miligramo

**°C:** grados centígrados

**µm:** micras

**VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana

**%:** porcentaje

**IFD:** inmunofluorescencia directa

**IFI:** inmunofluorescencia indirecta

**PCR:** Reacción de cadena polimerasa

**K:** Kappa

**VP+:** valor predictivo positivo

**VP-:** valor predictivo negativo

**IC:** índice de confiabilidad

**Se:** sensibilidad

**Sp:** especificidad

**C.R.:** Costa Rica

## RESUMEN

Este estudio se realizó con 115 muestras de heces caninas para el diagnóstico de *Giardia* spp. provenientes de diferentes clínicas veterinarias del Valle Central que remiten sus casos al laboratorio ACOPSA, localizado en Heredia, Costa Rica.

Las muestras fecales caninas se recolectaron en un periodo de 6 meses comprendidos entre marzo y agosto del 2005.

El diagnóstico respectivo para determinar la presencia del parásito en cada muestra se realizó a partir de los métodos diagnósticos del ELISA de captura (IDEXX®), microscopía directa, flotación con cloruro de sodio y tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain. De estas técnicas se eligió el ELISA de captura (IDEXX®) como prueba de oro, y a partir de ella, se logró realizar el estudio comparativo entre las pruebas elegidas. Se ejecutó un total de 460 procedimientos.

De las 115 muestras fecales, 30 fueron positivas a una o a varias de las técnicas citadas anteriormente, mientras que 85 muestras fueron negativas a todas ellas.

Se determinó las características de las pruebas (sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos) utilizando tablas de contingencia (2x2), así mismo se estableció la concordancia y la evaluación diagnóstica entre las mismas.

Finalmente, se concluye que la tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain es la técnica convencional con la mayor sensibilidad, convirtiéndose de este modo, en el método alternativo para el diagnóstico de *Giardia* spp.



## ABSTRACT

The present study was made with 115 samples of canine faeces, used for the diagnose of *Giardia* spp., coming from different veterinary clinics of the central valley of Costa Rica, that send their samples to Acopsa Laboratory in Heredia, Costa Rica.

The canine faeces samples were gather during a 6 months period between March and August, 2005.

The respective diagnose for determine the presence of the parasite on each sample, was made using the following diagnostic methods: capture ELISA (IDEXX®), direct microscopy, sodium chloride floatation and ferric haematoxylin dye of Heidenhain. Out of these techniques the capture ELISA (IDEXX®) was chosen as the gold standard method. A total of 460 procedures were carried-out.

From the 115 faecal samples, 30 were positive to one or more than one diagnostic method and 85 samples were negative to all the laboratory of the laboratory techniques.

The characteristics of the tests (sensitivity, specificity, and positive or negative predictive values) were described using contingency tables (2x2), also the concordance and the diagnostic evaluation was established between them.

Finally it is concluded that the ferric haematoxylin dye of Heidenhain is the conventional diagnostic technique with the highest accuracy, becoming the alternative diagnostic method for *Giardia* spp.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Antecedentes

### 1.1.1. Giardiasis

#### 1.1.1.1. Etiología

Las enfermedades del sistema digestivo causadas por parásitos son comunes e importantes. Las alteraciones se pueden relacionar con la presencia de diferentes agentes, tales como los tremátodos, los céstodos, los nemátodos y los protozoos que a su vez incluyen una amplia variedad de microorganismos unicelulares, varios de los cuales son patógenos importantes. Las especies cuyos signos principales son causados por la presencia de estadios intestinales (como *Giardia* spp.), se considerarán en primer lugar debido a que la infestación puede ser zoonótica (Fisher y McGarry, 2007). La giardiasis es una enfermedad que la causa la *Giardia* spp., que afecta el duodeno, el yeyuno y ocasionalmente el intestino grueso de los animales jóvenes. Se manifiesta mediante un síndrome de mala absorción y diarrea (Cordero et al., 1999; Thompson et al., 2000). *Giardia* spp. es un parásito protozoario flagelado entérico piriforme, con dos núcleos, ocho flagelos y un disco suctor en la parte ventral, que afecta los hospedadores. Fue uno de los primeros organismos que se estudió con ayuda del microscopio; Anton Loewenhoeck, descubrió este parásito en sus propias heces en 1681, pero científicamente fue descrito por primera vez en 1859. Hegner en 1922, postula que *Lambl. Giardia canis*, afecta a los cánidos y Deschines en 1925, establece que *Giardia cati* a los felinos. Ambas especies se encuentran incluidas dentro del grupo de *Giardia duodenalis*, sinónimo de *Giardia lamblia* y *Giardia intestinalis* (Conboy, 1997; Cordero et al., 1999).

Se han descrito alrededor de 40 especies del género *Giardia*. La clasificación tiene como base la ocurrencia del parásito según el hospedador que coloniza. Filice (1951),

propone una nueva clasificación en la que sugiere 3 tipos diferentes según la morfología: *Giardia agilis* en anfibios, *Giardia muris* en roedores y *Giardia duodenalis* en mamíferos; el grupo de *Giardia* que afecta al perro es el de *G. duodenalis*. Es el grupo mayor porque incluye 20 variedades descritas. Se usan otros nombres para este grupo como *G. lamblia*, *G. intestinalis*, *G. canis*, *G. felis*, *G. cuniculi*, entre otros. Sin embargo se enfatiza como nombre correcto el de *Giardia duodenalis* (Thompson et al., 2000). Gracias a estudios de transmisión cruzada, isozimas, y antigénicos se ha demostrado inequívocamente que se trata de la misma especie (Barriga, 2002).

En aves, también se reconocen dos especies distintas morfológicamente: *Giardia psittaci* y *Giardia ardeae* (Thompson et al., 2000).

#### **1.1.1.2. Presentación**

La giardiasis se puede presentar de dos formas: la asintomática la cual no manifiesta signos clínicos y los animales actúan como reservorios para el resto del grupo, y la forma de curso agudo y/o crónico, la cual se manifiesta mediante diarrea mucosa con abundante grasa, al día 4°- 5° pos-infección. Se alternan además periodos de estreñimiento o heces normales, hay fiebre, hasta de los 40°C; anorexia, pérdida del apetito, distensión y dolor abdominal, pelo sin brillo, ojos hundidos, deshidratación en grado diverso y ocasional, muertes en los animales afectados (Olson et al., 1996; Cordero et al., 1999).

Las infecciones clínicas severas ocurren usualmente en perros jóvenes, pero también puede acontecer en pacientes saludables, mientras que las infecciones subclínicas se manifiestan en animales adultos (Roudebush & Delivorias, 1985; Leib & Zajac, 1999).

La susceptibilidad a la infección, y la severidad de signos clínicos aparentemente es por el estado inmune del hospedador. Los hospedadores con inmadurez inmunológica e inmunosuprimidos son vulnerables a una infección severa y crónica (Olson et al., 2000).

#### **1.1.1.3. Ciclo Biológico**

La *Giardia* spp., es un parásito de ciclo directo, las formas quísticas eclosionan en el duodeno liberando un organismo de cuatro núcleos que se expulsa al exterior en las heces del animal, el estado parasitario se identifica por la resistencia, diseminación y transmisión. Estos quistes son inmediatamente infectantes y pueden permanecer viables por más de dos semanas en condiciones húmedas y de bajas temperaturas (Barriga, 2002).

La forma parásita, es el trofozoíto de 12-17  $\mu\text{m}$  x 7-10  $\mu\text{m}$ , se localiza adherido a la mucosa intestinal, en donde se divide activamente por fisión binaria. A medida que se desprende y se traslada a las zona más distal del intestino grueso, se forma el quiste, de forma ovalada o redondeada, con dimensiones de 9-13  $\mu\text{m}$  x 7-9  $\mu\text{m}$ , con cuatro núcleos en su interior, que al ser ingerido por un nuevo hospedero, en el estómago se inicia la exquistación, que se completa en el intestino por la acción de los componentes biliares, el ácido carbónico y proteasas pancreáticas. De esta forma se liberan los trofozoítos, se fijan a la mucosa y de nuevo hay fisión binaria. El ciclo completo es de 4-5 días (Cordero et al., 1999).

Los quistes son los responsables de la infección. En determinadas ocasiones, cuando las heces son diarreicas, se eliminan grandes cantidades de trofozoítos. A pesar de ser destruidos en el estómago, algunos pueden desplazarse al intestino, fijarse a la mucosa y continuar su desarrollo (Cordero et al., 1999).

#### **1.1.1.4. Signos clínicos**

Si se sospecha de un cuadro de giardiasis por los síntomas, se necesita confirmar la presencia de quistes en las heces formadas o de trofozoítos en las heces diarreicas (Barriga, 2002). La materia fecal diarreica, blanda y mucoide, inclusive hasta acuosa es el signo clínico de mayor frecuencia, junto con un aumento de la frecuencia de defecación. Los

signos clínicos varían considerablemente, incluso pueden ser autolimitantes en algunas especies, lo que podría atribuirse a algunas cepas que han logrado variar su grado de patogenicidad (Leib & Zajac, 1999).

*Giardia* spp. infecta primeramente el intestino delgado causando diarrea acuosa (que puede ser intermitente), la cual puede confundirse con enfermedad del intestino grueso con pasaje de muco, flatulencia y prolapso rectal. La esteatorrea y heces pálidas malolientes son un hallazgo clínico consistente. Hay pérdida de peso aún cuando se mantenga un apetito normal cuya causa podría justificarse por un cuadro de mala absorción – mala digestión (Pitts et al., 1983; Barr et al., 1993).

#### **1.1.1.5. Modo de Transmisión**

La principal ruta de transmisión es la orofecal y el nivel de infección es proporcional al estado higiénico sanitario de los animales. La ingestión de quistes viables que contaminan agua y alimentos; son condiciones para la manifestación de brotes de giardiasis, especialmente en áreas donde los animales están en estrecho contacto entre sí (Díaz et al., 1996; Cordero et al., 1999).

#### **1.1.1.6. Patogénesis en el animal**

La *Giardia* spp ejerce su acción patógena de varias formas; por un mecanismo traumático-irritativo, en las células intestinales, lo que ocasiona que se acorten las microvellosidades intestinales y haya destrucción del borde en cepillo de las células. Como consecuencia hay alteraciones en la digestión y mala absorción, de manera que los ácidos grasos son los más comprometidos, así como también los azúcares, vitaminas y proteínas. Ello se debe a una menor actividad de las disacaridasas. También tiene acción exfoliadora sobre elementos nutricionales, útiles para su propio metabolismo proteínas, hidratos de carbono, grasas del hospedador, e interfiriendo en el metabolismo de éste. Finalmente, tiene acción vectorial, ya que es capaz de transportar en su interior otros agentes

patógenos, virus, bacterias, micoplasmas, hongos y recientemente se ha descubierto la presencia del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1). Además, actúan como precursoras y desencadenantes de otras afecciones que padecen perros y gatos, tales como el moquillo y parvovirus (Cordero et al., 1999).

#### **1.1.1.7. Diagnóstico laboratorial**

El pasaje de parásitos en las heces no es continuo: un solo examen de deposiciones puede demostrar sólo 50 a 70% de las infecciones, por lo cual se recomienda obtener 3 muestras, una cada día por medio. Como los quistes son pequeños y transparentes, el examen microscópico puede facilitarse con el uso de anticuerpos fluorescentes anti *Giardia* spp., que otorgan fluorescencia a los parásitos. También existe un ELISA que determina la presencia de antígenos de *Giardia* en las deposiciones; en perros esta prueba es muy específica (95%) (Barriga, 2002).

El diagnóstico tradicionalmente ha dependido de un microscopio para la identificación de trofozoítos o quistes en heces frescas de animales afectados, sin embargo esta forma de diagnóstico puede ser difícil porque los quistes son delicados y pueden ser excretados intermitentemente, por lo que el uso de tratamientos previos como el caolín, un antidiarreico puede interferir con dicha excreción. La morfología del organismo también podría verse alterada por otras partículas presentes en las heces (I. L. I., 2004 a).

En muchas ocasiones se elige un método de laboratorio incorrecto, cuando se utilizan soluciones hipersaturadas de flotación estándar (salina y sucrosa), con la consecuencia de que los quistes sean irreconocibles, o bien, se usa la técnica de sedimentación con formalina que causa mucha distorsión, sin embargo estas son técnicas que se siguen utilizando. La flotación con sulfato de magnesio o sulfato de zinc es el método de elección para la concentración y detección de quistes de *Giardia* spp (Cordero et al., 1999).

No obstante, su alto costo económico impide su utilidad y es por esa razón que se excluye del presente estudio. La coloración con lugol o tricromo, podría resaltar la detección del parásito, sin embargo, aún mediante este método el resultado podría enmascarse en los casos de eliminación intermitente; lo que podría conllevar a una subestimación de la importancia de esta enfermedad (Hall et al., 1988; Olson et al., 2000).

La tinción de frotis de materias fecales, ya sea con hematoxilina férrica, negro de clorazol, Giemsa, entre otros, son otros métodos eficaces para el diagnóstico, siempre que la concentración de formas parasitarias sea elevada (Castro & Guerrero, 2004).

Existen cepas de *Giardia* que no eliminan quistes, “cepas silentes” y en este caso, las técnicas coprológicas no son las más adecuadas para su detección (Cordero et al., 1999).

El examen de fluidos duodenales obtenidos de una laparotomía o de una intubación duodenal es más confiable pero no es un procedimiento practicable de rutina. El “enterotest”, basado en la recogida de contenido duodenal mediante una cápsula unida a un largo hilo, es un método eficaz de diagnóstico en la especie humana, pero en los carnívoros se presentan dificultades, ya que es necesario sedar a los animales y mantenerlos bajo observación con rayos X mientras se realiza la toma de muestras (Cordero et al., 1999).

Las pruebas con base en la reacción antígeno-anticuerpo, se desarrollan para determinar la presencia del parásito. La inmunofluorescencia directa (IFD) es una opción que puede ser usada para facilitar el diagnóstico de *Giardia* spp., sin embargo se requiere un microscopio fluorescente y amplia experiencia para lograr identificar el quiste (Hall et al., 1988; Jacobs et al., 2001).

También se utilizan métodos inmunodiagnósticos como el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) para la detección de este parásito (Leguía, 2002).

Esta técnica de diagnóstico, al igual que la inmunofluorescencia indirecta (IFI) ofrece buenos resultados, pero es importante evitar que haya reacciones cruzadas con otros parásitos que asientan en el intestino (Cordero et al., 1999).

Los ELISA de uso humano son capaces de detectar antígeno de *Giardia* spp., en heces, sin embargo, las condiciones de desempeño de cualquiera de ellos no han sido claramente estudiados en perros y gatos, y además su costo es muy elevado. Recientemente un nuevo método de ELISA de captura llamado “SNAP® *Giardia* Test Kit de laboratorios IDEXX®”, es una determinación de coproantígeno de fácil realización que permite destacar la presencia del parásito, aunque no se eliminen quistes. Está disponible en el mercado para detectar antígeno de *Giardia* spp. en heces. Esta prueba comercial se diseñó especialmente para perros y gatos, la cual reúne ventajas de simplicidad, rápida ejecución y bajo costo (I. L. I., 2004 b).

Las pruebas muy sensibles a veces son caras y por ende en la práctica clínica habitual se recurre a pruebas más sencillas y menos costosas; sin embargo, es fundamental conocer la validez, exactitud y precisión de estas pruebas de uso cotidiano y con ello determinar su capacidad diagnóstica (Beaglehole et al., 1994).

#### **1.1.1.8. Diagnóstico diferencial**

Es importante tomar en cuenta otras causas de diarrea en cachorros y gatitos, como la infestación por *Cryptosporidium* sp e *Isospora* sp, infecciones virales y desordenes alimentarios (Fisher & McGarry, 2007).

#### **1.1.1.9. Tratamiento y control**

En general, todos los productos utilizados para el tratamiento de este proceso tienen alta eficacia (Cordero et al., 1999).



Entre autores, las dosis y duración del tratamiento varía. En términos generales, los perros pueden tratarse con metronidazol (25 mg/kg cada 12 horas, por 5 a 7 días), es eficaz en el 95% de los casos. La furazolidina (4 mg/kg cada 12 horas por 5 días), albendazol (25 mg/kg cada 12 horas, por 2 días), o febendazol (50 mg/kg diarios, por 3 días). La quinacrina, es el producto de elección para estas infecciones. Administrada por vía oral, 6.6 mg/kg/3 veces al día, durante 7 días consecutivos, cura la enfermedad en el 95% de los casos (Barriga, 2002).

En todos los casos, pero principalmente en los animales mayores, es conveniente descartar previamente otras posibles etiologías para la diarrea (Barriga, 2002).

El tinidazol a razón de 44mg/kg/día, durante 3 días, tiene una eficacia del 90%. Al igual que el metronidazol, presenta el inconveniente de reacciones secundarias (Cordero et al., 1999).

Algunos bencimidazolcarbamatos, como el mebendazol, 50 mg/kg/tres veces al día y actualmente el albendazol, en dosis de 25 mg/kg, cada 12 horas, durante 2 días, parece ser el producto más idóneo para combatir la enfermedad (Cordero et al., 1999).

El control de la transmisión de la giardiasis consiste en evitar la contaminación fecal de los alimentos y aguas de bebida y, en el caso del humano, de las manos. En los humanos esto es fácil de obtener con una combinación de saneamiento ambiental y educación sanitaria. El proceso para desinfectar los locales, el tratamiento de aguas residuales y de consumo, la detección y el tratamiento de animales portadores y enfermos, y el manejo adecuado de los animales, son medidas para la prevención, sin olvidar la aplicación de un programa de desinfección, desinsectación y desratización a todos los niveles (Cordero et al., 1999; Barriga, 2002).

En los criaderos de perros se debe recoger las heces frecuentemente, antes de que éstas se dispersen y contaminen el ambiente. Los quistes son sensibles a la desecación de

modo de que los pisos deben mantenerse secos y asoleados. Las soluciones desinfectantes de amonio cuaternario matan los quistes en 1 minuto a 20°C, el lisol y las soluciones domésticas de hipoclorito de sodio se demoran un poco más. En el caso de animales de granja, los comederos deben mantenerse elevados para disminuir el riesgo de contaminación con heces (Barriga, 2002).

La cloración del agua, inyección de ozono y las radiaciones ultravioletas son eficaces en un 99%, lo que permite mantener viables a un bajo número de quistes, pero suficientes para que pueda establecerse una infección (Cordero et al., 1999).

Los desinfectantes a base de kilol, un compuesto orgánico natural, derivado del ácido ascórbico, extraído de la semilla de la toronja, es efectivo en la destrucción de quistes de *Giardia* spp, ya que rompe su pared celular y el citoplasma, dañando así el ciclo vital de la célula e impidiendo su multiplicación (Castellón et al., 1992).

La inmunoprofilaxis ofrece un método para controlar la infección en poblaciones de alto riesgo, ya sea sintomática o asintomática. Una vacuna efectiva debe ayudar a romper la transmisión fecal-oral y la que ocurre a través del agua de bebida, reduciendo la contaminación ambiental. Existe, una vacuna para *Giardia* spp. que está disponible comercialmente en Costa Rica, eficaz para la prevención de los signos clínicos de la giardiasis y la reducción de la diseminación de quistes en perros y gatos, basada sobre el estado actual de conocimientos sobre la antigenicidad y la inmunogenicidad (Olson et al., 2000).

## **1.2 Justificación**

Debido a los múltiples eventos que se relacionan con la ingestión de alimentos contaminados, es importante destacar los agentes etiológicos responsables de enfermedades zoonóticas emergentes. Se conocen aproximadamente 200 enfermedades que se transmiten mediante alimentos. Los agentes etiológicos de estas enfermedades

incluyen: bacterias, virus, rickettsias, priones, parásitos, toxinas y metales. Los síntomas de estas enfermedades van desde ligeras gastroenteritis, hasta los síndromes que cursan con tratamientos hepáticos, renales y neurológicos de por vida (Terán & del Barrio, 2005).

El Director General de la OIE (Organización Mundial de Salud Animal) durante la 14ª Reunión Interamericana a Nivel Ministerial en Salud y Agricultura, que se efectuó en México en abril del 2005, destacó la importancia de las enfermedades zoonóticas. Indicó que el 60% de los agentes patógenos de los seres humanos son zoonóticos, el 75% de las enfermedades emergentes son zoonóticas y el 80% de los agentes patógenos de los animales tienen huéspedes múltiples (Terán & del Barrio, 2005).

En este estudio, la principal razón para el control de la giardiasis en las poblaciones caninas, es el riesgo de infección para la población humana.

Existen lugares con mayor incidencia de esta enfermedad (guarderías infantiles), razón por la cual se debe de contar con controles más estrictos de higiene para evitar mayor repercusión en el campo de la salud pública. No obstante, estudios realizados en estas guarderías, indican una drástica disminución en la prevalencia de parásitos intestinales en nuestro país en las últimas décadas. Este hecho es de gran importancia, puesto que se evidencian mejoras en la educación de los niños, con respecto a los hábitos higiénicos, promiscuidad y carencia de agua potable (Reyes et al., 1987).

La giardiasis canina ha ganado gran reconocimiento en la medicina de pequeñas especies durante las últimas cuatro décadas (Zimmer & Burrington, 1985).

Es una enfermedad frecuentemente asintomática, pero puede causar enfermedad en personas, perros, gatos y, posiblemente en “animales de granja”. Los parásitos adosados a la mucosa intestinal apenas causan alguna hipertrofia de las criptas y alguna atrofia de las vellosidades, pero provocan un aumento de las secreciones con una disminución de la

absorción. Se cree que estos cambios son debidos a alteraciones en la bioquímica de la mucosa causadas por el parásito. Los síntomas en el humano van desde deposiciones blandas intermitentes hasta franca diarrea aguda a crónica, a veces con mucosidades o alto contenido de grasas, dolor abdominal, y pérdida de peso (Barriga, 2002).

La evidencia clínica indica que los síntomas en los carnívoros domésticos son similares (Barriga, 2002).

Se cree que es una enfermedad zoonótica importante y dentro de los animales reservorios se citan los gatos, perros, ratas, hurones, rumiantes y una variedad de animales silvestres. El carácter zoonótico se demuestra por las infecciones cruzadas que se realizan con aislamientos de diferentes especies de animales y del hombre. Esta definición de zoonosis se apoya en el estudio que se realizó en Australia, en donde se demostró que cepas de este protozooario aisladas de gatos son genéticamente idénticas a las obtenidas de humanos, considerándose que los gatos son adecuados reservorios para la infección humana (Hahn et al., 1988; Olson et al., 1996; Cordero et al., 1999).

Aunque la presencia de *Giardia* spp. es común, es importante hacer referencia a los factores que influyen en la patogenia. Con respecto al parásito, influye el tipo de cepa, por la patogenicidad inherente de cada una de ellas. Según la cantidad de quistes ingeridos, cuanto mayor sea el número, hay mayor posibilidad de desarrollo, aunque un solo quiste es capaz de desarrollar un cuadro patológico. En cuanto al hospedador, la edad constituye el factor más importante. Aún cuando la giardiasis puede afectar animales de toda edad, independientemente de la raza y el sexo; los más afectados son los cachorros comprendidos entre 1 y 8 meses de edad y los adultos inmunodeficientes, siendo los animales más jóvenes los comúnmente más afectados que los más viejos, posiblemente por algún grado de inmunidad protectora ya desarrollada (Cordero et al., 1999; Leguía, 2002).

La amplia variación de patogenicidad puede estar relacionado a la respuesta inmune del hospedador o estatus nutricional, la presencia de otros parásitos o enfermedades gastrointestinales. Parece que las inmunoglobulinas tipo A (IgA) y los linfocitos T están involucrados en la respuesta inmune para especies de *Giardia* spp. Las IgA específicas para especies de *Giardia* spp. previenen el ataque de los trofozoitos a la mucosa (Leib & Zajac, 1999).

Si al medio se refiere, la humedad y la temperatura, higiene de los locales y el manejo de los animales son factores que influyen en la presentación del proceso (Cordero et al., 1999).

Algunos estudios han reportado prevalencias de alrededor del 10 % en perros bien cuidados, por arriba del 50% en cachorros y hasta un 100% en perros de criaderos (Barr et al., 1993).

En otros estudios se reportan prevalencias que oscilan del 4% al 90% y se menciona que la población afectada puede alcanzar al 100% de los individuos, con una mortalidad que no suele pasar del 2% - 3% (Cordero et al., 1999).

Sin embargo, estos porcentajes suelen variar dependiendo de la zona geográfica, método de detección y población estudiada (Barr et al., 1992).

En la septuagésima quinta reunión general de OIE en Francia en mayo de 2007, se acordó desarrollar el proyecto de resolución N° XXXIII: “Utilización de modelos epidemiológicos para la gestión de enfermedades animales. Esto al considerar que los modelos epidemiológicos son un valioso instrumento que puede ayudar a las autoridades a identificar y evaluar los enfoques existentes y/o nuevos para luchar contra las enfermedades y reducir los riesgos” (OIE, 2007).

El desarrollo de estos modelos epidemiológicos y su análisis, se efectúan para evaluar la efectividad del control de animales con enfermedades detectables en la población canina, como lo es el caso de la giardiasis.

### **1.3. Obejtivos**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Evaluar estadísticamente tres métodos convencionales de laboratorio para el diagnóstico de *Giardia* spp.: microscopía directa, flotación fecal con cloruro de sodio, tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain tomando como referencia un ELISA de captura (SNAP *Giardia* Test Kit de laboratorios IDEXX®), para establecer cual de las técnicas tradicionales es la más confiable.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Determinar las condiciones de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos de las pruebas convencionales (microscopía directa, flotación con cloruro de sodio y tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain), tomando como prueba de oro un ELISA de captura (SNAP *Giardia* Test Kit de laboratorios IDEXX®), para establecer cual prueba convencional posee las mejores condiciones.
- Estimar la concordancia mediante el valor Kappa de las pruebas diagnósticas convencionales (microscopía directa, flotación fecal con cloruro de sodio, tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain) con relación al ELISA de captura (IDEXX®).
- Determinar cual técnica convencional es aproximadamente más confiable con respecto al ELISA de captura (SNAP *Giardia* Test Kit de laboratorios IDEXX®).

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1 Origen de las muestras fecales**

Este estudio se llevó a cabo con 115 muestras de heces caninas recolectadas en un periodo de 6 meses comprendidos entre marzo y agosto del 2005, provenientes de diferentes clínicas veterinarias del Valle Central que remiten sus casos al laboratorio ACOPSA, localizado en la ciudad de Heredia (ver anexo 1). El diagnóstico respectivo para determinar la presencia del parásito, se realizó a partir de los métodos diagnósticos del ELISA de captura (IDEXX®), microscopía directa, flotación con cloruro de sodio y tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain.

### **2.2 Selección de muestras fecales**

En este estudio para determinar la historia natural y el pronóstico, la selección de pacientes debió hacerse de manera aleatoria para evitar un sesgo de selección que podría alterar la información obtenida según Beaglehole et al., (1994). Sin embargo, como no se pretendió medir la prevalencia o incidencia de la enfermedad, el uso de una población sesgada no tuvo relevancia. Se evaluaron heces de consistencia normal, sin embargo la prioridad estuvo enfocada sobre las muestras fecales con condiciones tales como: heces pálidas, malolientes o esteatorreicas, para identificar *Giardia* spp. (Gómez, 1998).

### **2.3 Métodos diagnósticos**

Los métodos seleccionados para este estudio se eligieron por ser las técnicas comúnmente utilizadas en nuestro país para el diagnóstico de *Giardia*. De tal forma, fue indispensable conocer acerca de las ventajas y desventajas que cada una de ellas provee (Mellhorn, 1993).

Se evaluaron tres métodos convencionales de laboratorio (microscopía directa, flotación con cloruro de sodio y tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain) para el



diagnóstico de *Giardia* spp. con respecto al ELISA de captura IDEXX®, siguiendo el protocolo para la ejecución de los diagnósticos. Inicialmente se realizó la técnica de microscopía directa descrita por Castro & Guerrero (2004), luego la técnica de flotación con cloruro de sodio según Sloss et al., (1994); cabe mencionar que en sustitución de esta técnica la mejor para identificar los quistes de *Giardia* spp. es la flotación con sulfato de zinc, una solución al 33% que tiene la ventaja de causar menos distorsión a los quistes de *Giardia* spp., pero su costo es mayor que el de otras sales comúnmente usadas, razón por la cual se excluye del presente estudio (Zajac, 1992; Sloss et al., 1994).

Después se aplicó el ELISA de captura (IDEXX®) y finalmente un frotis para la tinción con la hematoxilina férrica de Heidenhain descrita por Castro & Guerrero (2004), procedimiento que se realizó en la Universidad de Costa Rica.

### **2.3.1 Prueba de oro o ELISA de captura (IDEXX®)**

El “SNAP *Giardia* Test Kit de laboratorios IDEXX®” fue elegido como prueba de oro por reunir las condiciones para detectar una enfermedad subclínica y también reemplazar otras técnicas más laboriosas. Además, su validez alta expresada a partir de la sensibilidad (Se) y la especificidad (Sp) que fue de aproximadamente el 100%, indica que el suministro de los porcentajes de resultados falsos positivos y falsos negativos son muy limitados (I. L. I., 2003).

Este ELISA es un kit individual aplicable para una sola muestra de heces y éstas se pueden usar frescas, previamente congeladas, o guardadas hasta por 7 días a 2-7°C (36-45°F), en los dos últimos casos es necesario temperar las muestras 10 ó 15 minutos antes de comenzar el procedimiento. El kit para la prueba de SNAP *Giardia* es un inmuno ensayo enzimático rápido para la detección del antígeno de *Giardia* spp. en heces de caninos y felinos. La presencia de este antígeno en muestras fecales indica que el animal

ingirió quistes de *Giardia* spp, y que a su vez pudo tener una infección activa eliminando quistes en las heces, los cuales se mantienen viables durante largo tiempo (I. L. I., 2003).

Cada kit está compuesto por un dispositivo de conjugado presente en el hisopo que a su vez contiene Anti-*Giardia*, esto es una solución de conjugado de peroxidasa (que contiene gentamicina como preservante); y el dispositivo SNAP contiene un reactivo de solución de sustrato y otra solución de lavado (I. L. I., 2003).

El ELISA de captura IDEXX®, se fundamenta en que el trofozoíto de *Giardia* necesita adherirse a la pared intestinal y esto lo hace mediante unas vesículas específicas de enquistación, las cuales liberan unas proteínas solubles que están presentes en las heces del animal. El dispositivo detecta el antígeno de la proteína soluble de las vesículas de enquistación del parásito, también presente en su forma quística. Una vez recolectada la muestra con el hisopo del kit, se dobla suavemente el bulbo hasta romper el sello que lo une al hisopo. Se oprime tres veces el bulbo para mezclar el conjugado con la muestra recolectada y posteriormente se agregan 5 gotas de la mezcla al pozo de muestra del kit; la muestra fluye por el cromex y luego de alcanzar la ventana de activación, el dispositivo se oprime para finalmente leer los resultados en 8 minutos. Al realizar la activación del kit, en él se liberan una solución de lavado que remueve todo aquello que no está participando de la reacción (con ello se elimina el ruido de fondo de la prueba), seguido después de la liberación del sustrato, el cual, romperá las moléculas de color que están unidas a la reacción antígeno – anticuerpo del kit, marcando de esta manera la ventana de resultados. Un resultado negativo se da cuando en la ventana de resultados no aparece ningún color en el punto de muestra. Por otra parte, el resultado es positivo cuando aparece el color en el punto de muestra. (I. L. I., 2003).

De esta manera, a mayor color presente en la ventana de resultados de la muestra, es indicativo de mayor presencia de antígeno. (I. L. I., 2004 a). Ver anexo 2.

La facilidad de la técnica y el respaldo obtenido a partir de estudios realizados en México y Estados Unidos demuestran que este ELISA de captura (IDEXX®) es la herramienta que tiene la mejor capacidad para el diagnóstico de *Giardia* spp. (I. L. I., 2004 b).

#### **2.4 Análisis de las pruebas**

Se determinó los valores de las pruebas convencionales (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo), así como la concordancia entre ellas, utilizando tablas de contingencia (2x2) según Thrusfield et al., (2001).

De estas tablas también se logró calcular parámetros que determinaron la posibilidad de que un animal positivo a las pruebas estuviera realmente enfermo valor predictivo positivo (VP+) o bien, la posibilidad de que un animal negativo a las pruebas estuviera realmente sano valor predictivo negativo (VP-).

Con el aporte del programa Win Episcopo 2.0, la concordancia entre los test diagnósticos se realizó confrontando la prueba de oro (ELISA de captura de laboratorios IDEXX®) con respecto a cada una de las técnicas tradicionales. En cada relación la conformidad pudo expresarse por medio del valor Kappa tomando en cuenta que un valor  $K=1$  representa una concordancia perfecta, más allá de la intervención al azar, pero si  $K=0$  no existe concordancia. Para la mayoría de los casos, valores mayores a 0.75 se interpretan como una concordancia excelente, entre 0.75 y 0.40, como buena a regular y menores a 0.40 como pobre. En el caso de la comparación entre pruebas diagnósticas se necesita un Kappa de al menos 0.40 a 0.50 para indicar un nivel de acuerdo moderado (Martín et al., 1987; Tarabla, 2000; Molinero, 2001; Thrusfield et al., 2001).

Para efectos de cálculos se utilizó un intervalo de confianza al 95% (Win Episcopo, 2000).

### 3. RESULTADOS

De las 115 muestras fecales, 30 fueron positivas a una o a varias técnicas a la vez (microscopía directa, flotación con cloruro de sodio, tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain y el ELISA de captura de laboratorios IDEXX®), mientras que 85 muestras fueron negativas a todas las técnicas en estudio.

La concordancia entre el ELISA de captura (IDEXX®) y la microscopía directa, como se indica en el Cuadro 1, demostró ser muy baja. Lo anterior se confirma por el valor Kappa 0.261 (IC95%, 0.126-0.395). Los valores en cada caso se detallan a continuación. El número 6 (a) representa la cantidad de casos positivos para ambas técnicas, el 1 (b) muestra el número de falsos positivos y el número 23 (c) es la cantidad de muestras que fueron positivas al ELISA de captura (IDEXX®) pero negativas a la microscopía directa, estos serían los falsos negativos. Finalmente, el número 85 (d) es la cantidad de muestras totales negativas a ambos test, cabe destacar que esta última condición se repitió en los otros dos casos (ver cuadro 2 y cuadro 3).

**Cuadro 1. Concordancia entre el ELISA de captura (IDEXX®) y la microscopía directa.**

		<b>ELISA de captura (IDEXX®)</b>		
		<b>+</b>	<b>-</b>	<b>Total</b>
<b>Microscopía directa</b>	<b>+</b>	<b>6 (a)</b>	<b>1 (b)</b>	<b>7</b>
	<b>-</b>	<b>23(c)</b>	<b>85(d)</b>	<b>108</b>
<b>Total</b>		<b>29</b>	<b>86</b>	<b>115</b>

En el cuadro 2, las dos técnicas en confrontación tuvieron la habilidad para detectar 14 (a) muestras fecales positivas a *Giardia* spp., un solo caso (b) fue negativo al ELISA de captura (IDEXX®) pero positivo a la flotación con cloruro de sodio y 15 (c) muestras representaron el número de falsos negativos. También existió una baja concordancia; sin embargo, en esta ocasión el valor Kappa es de 0.561 (IC95%, 0.392-0.730), lo cual indica un nivel moderado de concordancia.

**Cuadro 2. Concordancia entre el ELISA de captura (IDEXX®) y la flotación fecal con cloruro de sodio.**

		<b>ELISA de captura (IDEXX®)</b>		
		<b>+</b>	<b>-</b>	<b>Total</b>
<b>Flotación con cloruro de sodio</b>	<b>+</b>	<b>14 (a)</b>	<b>1 (b)</b>	<b>15</b>
	<b>-</b>	<b>15(c)</b>	<b>85(d)</b>	<b>100</b>
<b>Total</b>		<b>29</b>	<b>86</b>	<b>115</b>

La concordancia entre el ELISA de captura (IDEXX®) y la tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain está reflejada en el cuadro 3. En él, se puede notar que en comparación a los casos anteriores hubo un número mayor de pruebas positivas a ambos test, 17 (a). El 1 (b) corresponde a un caso falso positivo y 12 (c) muestras fueron positivas al ELISA de captura (IDEXX®) pero negativas a la tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain. El valor Kappa fue de 0.657 (IC95%, 0.482-0.832).

**Cuadro 3. Concordancia entre el ELISA de captura (IDEXX®) y la tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain.**

		<b>ELISA de captura (IDEXX®)</b>		
		<b>+</b>	<b>-</b>	<b>Total</b>
<b>Hematoxilina</b>	<b>+</b>	<b>17 (a)</b>	<b>1 (b)</b>	<b>18</b>
<b>férrica de</b>	<b>-</b>	<b>12(c)</b>	<b>85(d)</b>	<b>97</b>
<b>Heidenhain</b>				
	<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>86</b>	<b>115</b>

Los valores obtenidos de las condiciones de las técnicas convencionales se enlistan en el cuadro 4. De ahí mismo, se desplegaron otras asociaciones que determinaron la utilidad de las técnicas entre sí, donde las variables con mayor importancia son la sensibilidad y los valores predictivos positivos.

**Cuadro 4. Valores de Se, Sp, VP+ y VP- para las técnicas de microscopía directa, flotación fecal con cloruro de sodio y la tinción con Hematoxilina férrica de Heidenhain, tomando como prueba de oro el ELISA de captura (IDEXX®).**

<b>TECNICA</b>	<b>SENSIBILIDAD (Se)</b>	<b>ESPECIFICIDAD (Sp)</b>	<b>VALOR PREDICTIVO POSITIVO (VP+)</b>	<b>VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (VP-)</b>
Tinción con hematoxilina férica de Heidenhain	<b>58.6</b>	<b>98.83</b>	<b>94.40</b>	<b>87.6</b>
Flotación con cloruro de sodio	<b>48.27</b>	<b>98.83</b>	<b>93.33</b>	<b>85.0</b>
Microscopía directa	<b>20.69</b>	<b>98.83</b>	<b>85.71</b>	<b>78.70</b>

#### **4. DISCUSIÓN**

Las circunstancias para establecer el verdadero estado sanitario de una población animal, en la mayoría de los casos son difíciles. Por esta razón frecuentemente se conduce a la necesidad de utilizar un método eficaz con condiciones suficientemente aceptables para pronósticos prácticos (Thrusfield et al., 2001).

La manera más simple y frecuente para medir el grado de acuerdo entre los resultados de dos pruebas es la proporción de concordancia general. Esta es igual a la suma de la probabilidad de los resultados positivos y negativos a ambas pruebas (Tarabla, 2000).

Un resultado verdadero positivo es consecuencia de una infección real. Los resultados falsos positivos pudieron haberse producido por diversas razones. Con respecto al ELISA de captura (IDEXX®), era de esperar reacciones cruzadas de grupo entre un agente infeccioso y anticuerpos frente a distintos microorganismos con antígenos similares (Thrusfield, 1990).

Sin embargo, lo anterior no aplicó para este ELISA, debido a su particular propiedad de detectar al antígeno descrito en la sección de materiales y métodos (I. L. I., 2004 a).

Un resultado verdadero negativo indicó ausencia de infección; sin embargo, se evidenciaron resultados falsos negativos, lo cual pudo estar relacionado con la presencia de una tolerancia natural o inducida a los antígenos, y por tanto no producen anticuerpos cuando entran en contacto con el agente (Thrusfield, 1990).

Sin embargo, para cualquier relación entre dos pruebas, se necesitó más que una medida del grado de acuerdo entre ellas mismas, dado que salvo en circunstancias extremas, es dable esperar algún grado de concordancia debido solamente a la intervención del azar. Una medida que corrigió esto es la razón denominada Kappa, útil como una



medida de exactitud, medio de cuantificación y entendimiento (Martín et al., 1987; Tarabla, 2000; Thrusfield et al., 2001).

De los valores Kappa obtenidos en el presente estudio, ninguno fue  $\geq$  a 0.80, de lo anterior se concluye que en ninguna de las relaciones entre los test se logró obtener una concordancia excelente. La concordancia entre la prueba de oro y la microscopía directa fue pobre, mientras que la relación existente por parte de las otras dos pruebas convencionales (flotación con cloruro de sodio y tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain) fue buena. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que la comparación de dos o más pruebas solo indica el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas, pero de ninguna manera si una prueba es más sensible o específica que otra, ni sirve como medida de las mismas (Tarabla, 2000; Trusfield et al., 2001).

Con las pruebas diagnósticas convencionales, el diagnóstico para *Giardia* spp. fue inexacto. Sin embargo lo anterior pudo estar relacionado con la forma intermitente de liberación del parásito y con la viabilidad de los trofozoítos y quistes en el medio.

Se debe tomar en cuenta que la realización de la prueba hecha en un momento inapropiado puede dar lugar al fracaso de la misma en la detección de la infección. Dicha situación ocasiona en la mayoría de los casos la imposibilidad de llegar a un diagnóstico definitivo lo cual compromete a la salud pública por el riesgo zoonótico que presenta la giardiasis (Thrusfield, 1990).

Por otra parte, también se requiere mucha destreza por parte del operador que realiza las pruebas (Sloss et al., 1994).

El propósito de las pruebas diagnósticas es ayudar a confirmar los posibles diagnósticos sugeridos, por esta razón el conocimiento de características propias de cada prueba (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo), resulta esencial para determinar su utilidad en la práctica clínica habitual. Estos valores en

realidad constituyen promedios referentes al poder discriminatorio de una prueba dada. No obstante, no es posible tenerlo todo simultáneamente. Por ejemplo, el valor predictivo describe como puede funcionar una prueba en una población, pero es muy poca información sobre su poder discriminatorio entre sanos y enfermos (Tarabla, 2000).

En este estudio, para diseñar una estrategia de combinación entre pruebas diagnósticas no solo bastó conocer acerca de la sensibilidad (95-96%) y especificidad (99-100%) de la prueba de oro, si no también otras características que le dan beneficio con respecto a las otras técnicas convencionales (costos económicos por muestra procesada, tiempo efectivo para la obtención de resultados y disponibilidad de los materiales). Además, se destacó la particularidad del ELISA de captura (IDEXX®), por tener capacidad de detectar siempre el antígeno soluble ya sea en fase temprana o tardía de la enfermedad o bien, durante un proceso agudo o crónico.

Lo anterior además respondió a lo descrito por Gómez (1998), desde el punto de vista económico; ya que el ELISA de captura (IDEXX®) requirió pequeñas cantidades de heces para su ejecución y la disponibilidad de los materiales estuvieron contenidos en cada test (lo cual no siempre es factible en la realización de una prueba). La simplicidad de ésta técnica también resultó ser una consideración de importancia, por lo tanto es una técnica que puede ser fácilmente utilizada en lugares donde no hay personal técnico entrenado disponible y con certeza la objetividad para la lectura del resultado no variar a pesar de que la prueba se realice por diferentes observadores y finalmente es una técnica muy segura porque la utilización de los antígenos vivos no representó el escape de material infeccioso a poblaciones susceptibles o al mismo operador.

El ELISA de captura (IDEXX®), permitió evidenciar que los animales tuvieron una evidente exposición actual o anterior al agente infeccioso. El que ésta prueba haya detectado animales enfermos o no, dependió no sólo de la exposición al antígeno

específico, si no también de la capacidad de la prueba de oro para detectarlos. Los animales con títulos detectables de antígeno fueron los positivos, aquellos otros que no tuvieron antígenos detectables fueron los negativos.

El cuadro 4 será de ahora en adelante utilizado como base para la presentación de los conceptos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos. La técnica de tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain fue la prueba con mayor sensibilidad, esto comparado a los resultados de las otras pruebas evidenció que a medida que aumenta la sensibilidad, aumentan los diagnósticos positivos verdaderos y disminuyen los falsos negativos (Tarabla, 2000).

Por otra parte, las técnicas convencionales en general muestran los mismos valores de especificidad, es decir que la habilidad fue la misma para detectar un animal sano en una población sana. A medida que aumenta la especificidad, aumentan los diagnósticos negativos verdaderos y disminuyen los falsos positivos.

El valor predictivo positivo más elevado fue alcanzado por la misma técnica de tinción. Esto significa que ante un resultado positivo a la prueba diagnóstica, la probabilidad de que ese individuo esté realmente enfermo es del 94.40%, mientras que un animal negativo a esta prueba diagnóstica tiene un 87.6% de posibilidades de estar realmente sano.

Se determinó que en ausencia de la prueba ELISA de captura (IDEXX ®), la mejor opción diagnóstica es la tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain, otra ventaja que tiene la tinción, es que en parasitosis elevadas permite mediante el microscopio, observar claramente al parásito en sus dos formas de presentación (trofozoíto y quiste), (ver anexo 3). Sin embargo, es importante destacar que es una técnica que conlleva una ejecución larga y tediosa, por el tiempo entre cada paso del proceso, además del tiempo de espera para obtener el resultado final. Por otra parte, a pesar de que su costo económico es similar

al del ELISA de captura (IDEXX®), se necesitan como mínimo 5 muestras para poder llevar a cabo la tinción, mientras que el ELISA se utiliza para una sola muestra, y el resultado se obtiene en menor tiempo.

#### 4.1. Conclusiones

- Para realizar un diagnóstico certero, es de suma importancia realizar pruebas laboratoriales que respalden nuestros hallazgos; la presencia de diarrea mal oliente y con esteatorrea no es sinónimo de *Giardia*.
- De las pruebas diagnósticas comúnmente utilizadas en Costa Rica para el diagnóstico de *Giardia* spp., se comprobó que la Tinción de hematoxilina férrica de Heidenhain es la prueba diagnóstica con mayor sensibilidad al compararse con el ELISA de captura (IDEXX®). (cuadro No. 4). Sin embargo por factores como costo por prueba y demora en resultados, no es una prueba versátil.
- La prueba de microscopía directa es la técnica de menor sensibilidad comparada con las otras dos técnicas laboratoriales estudiadas (Flotación con cloruro de sodio y la tinción con hematoxilina férrica). (cuadro No. 4).
- La Tinción de hematoxilina férrica de Heidenhain obtuvo un valor Kappa de 0,657, lo cual establece una concordancia moderada entre ésta prueba diagnóstica y la prueba de ELISA de captura (IDEXX®).
- Se determinó que la especificidad de las tres pruebas diagnósticas convencionales comparadas con el ELISA de captura (IDEXX®) es la misma para las tres.
- Se estableció que en ausencia de la prueba de ELISA de captura (IDEXX®) la mejor prueba diagnóstica es la tinción, aunque ésta última lleva un proceso largo, tedioso y que la obtención del resultado tarda más, que la prueba de ELISA de captura (IDEXX®) con la cual se obtiene un resultado en ocho minutos.
- Se facilita el diagnóstico realizando un examen físico exhaustivo del paciente, junto a una historia clínica detallada, además del uso de las técnicas laboratoriales diagnósticas.

- La ventaja del ELISA de captura (IDEXX®), es la detección temprana de la enfermedad.

## 4.2. Recomendaciones

- A los médicos veterinarios, en todos los casos que sea posible, hacer uso de los diferentes exámenes de laboratorio, para llegar así al diagnóstico definitivo, tratando de esta manera de ser menos empíricos y de hacer un mejor abordaje clínico.
- Mantenerse actualizados sobre las nuevas técnicas diagnósticas que circulan en el mercado con el fin de brindarle al cliente resultados laboratoriales con brevedad al mismo momento de la consulta.
- Hacer uso de cuestionario o ficha clínica para recopilar la información relevante, de esta manera siempre se obtendrán los datos más relevantes del problema clínico para lograr establecer el diagnóstico y llevar control de la evolución clínica del caso.
- Tratar de dar seguimiento a los casos positivos a la enfermedad, no sólo instaurando un protocolo de tratamiento, si no también, evaluando periódicamente las heces del paciente.
- A los propietarios, no instaurar tratamientos caseros, o peor aun, automedicar al paciente. Con esto podría enmascarse el problema clínico real.
- Mejorar las medidas de higiene en aquellos lugares donde haya mayor incidencia de casos de giardiasis.
- Al Colegio de Médicos Veterinarios, fomentar programas de educación de salud pública con respecto a la giardiasis en los niños de Costa Rica.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Barriga, O. O. 2002. La giardiasis. pp: 174-175. *In*. Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos. ed. Germinal. Santiago, Chile.
- Barr, S. C, D. D. Bowman & H. N. Erb. 1992. Evaluation of two test procedures for diagnosis of giardiasis in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 53: 2028-2031.
- Barr, S. C, D. D. Bowman, R. L. Heller & H. N. Erb. 1993. Efficacy of albendazole against giardiasis in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 54: 926-928.
- Beaglehole. R., R. Bonita & T. Kjellstrom. 1994. Epidemiología básica. Organización Panamericana de la Salud, Washington, D.C.
- Castellón, A., L. Reyes, M. Chinchilla & D. Mora. 1992. Viabilidad de los quistes de *Lamblia* intestinales bajo diferentes condiciones. *Rev. Cost. Cienc. Med.* 13: 9-15.
- Castro, A. & O. M. Guerrero. 2004. Técnicas de diagnóstico parasitológico. Editorial UCR. San José, C. R.
- Conboy, G. 1997. *Giardia*. *Can Vet. J.* 38: 245-247.
- Cordero, M., F. A. Rojo, A. R. Martínez, M. C. Sánchez, S. Hernández, I. Navarrete, P. Diez, H. Quiróz & M. Carvalho - Alonso de Vega. 1999. Giardiosis. pp 620-623. *In* M. Cordero & F. A. Rojo, (eds.). Diagnóstico de las parasitosis. McGraw Hill. Interamericana, Madrid, España.
- Díaz, V., M. Campos, J. Lozano, I. Mañas & J. González. 1996. Aspects of animal giardiosis in Granada province (southern Spain). *Vet. Parasitol.* 64: 171-176.
- Fisher, M. & J. McGarry. 2007. Fundamentos de parasitología en animales de compañía. ed. Inter-Médica, Buenos Aires, Argentina.
- Gómez, M. 1998. Elementos de estadística descriptiva. 12a. ed. UNED, San José, C. R.
- Hahn, N. E., C. A., Glaser, D. W. Hird & D. C. Hirsh. 1988. Prevalence of *Giardia* in the feces of pups. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192: 1428-1429.



- Hall, E. J., H. C. Rutgers & R. M. Batt. 1988. Evaluation of the peroral string test in the diagnosis of canine giardiasis. *J. Small. Anim. Pract.* 29: 177-183.
- I.L.I. (IDEXX Laboratories, Inc.). 2003. Giardia antigen test kit, versión # 1. I.L.I., E.E.U.U.
- I.L.I. (IDEXX Laboratories, Inc.). 2004 a. Estudio de pruebas en la práctica clínica para el diagnóstico de las infecciones de *Giardia* en perros y gatos. I.L.I., E.E.U.U.
- I.L.I. (IDEXX Laboratories, Inc.). 2004 b. Quick course: giardia in dogs and cats: more common than you think. I.L.I., E.E.U.U.
- Jacobs, S. R., C. P. R. Forrester & J. Yang. 2001. A survey of the prevalence of *Giardia* in dogs presented to Canadian veterinary practices. *Can. Vet. J.* 42: 45-46.
- Leguía, G. 2002. Enfermedades parasitarias: epidemiología y control de perros y gatos. F. S. Díaz, ed. Mar EIRL, Lima, Perú.
- Leib, M. S. & A. M. Zajac. 1999. Giardiasis in dogs and cats. *Vet. Med.* 3: 793-800.
- Martin, W. & B. Bonnett. 1987. Clinical epidemiology. *Can. Vet. J.* 28: 318-325.
- Mellhorn, D. & D. Duwel. 1993. Manual de parasitología veterinaria. Grass-Iatros, Barcelona, España.
- Molinero, L. M. 2001. Errores de medida en variables numéricas: correlación y concordancia. [en línea]. 1ra ed. Alce Ingeniería. España. Bioestadística@alceingenieria.net (Consulta: 14 oct. 2007).
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2007. Utilización de modelos epidemiológicos para la gestión de las enfermedades animales. Proyecto de resolución N° XXXIII de la 75° sesión general del comité internacional de la OIE. OIE, París, Francia.
- Olson, M. E., D. W. Morek & H. Ceri. 1996. The efficacy of a *Giardia lamblia* vaccine in kittens *Can. Vet. Res.* 60: 249-256.

- Olson, M. E., H. Ceri & D. W. Morck. 2000. *Giardia* Vaccination. Parasitol. Today. 16: 213-217.
- Pitts, R. P., D. C. Twedt & K. A. Mallie. 1983. Comparison of duodenal aspiration with fecal flotation for diagnosis of giardiasis in dogs. J.Am.Vet.Med.Assoc. 182: 1210-1211.
- Reyes, L., R. Marín, G. Catarinella, A. Vargas, E. Valenciano, C. Albertazzi, R. Novigrodt & M. Chinchilla. 1987. Parasitosis intestinal en niños en guarderías de San José, Costa Rica. Rev. Cost. Cienc. Med. 8: 123-128.
- Roudebush, P. & M. H. Delivorias. 1985. Duodenal aspiration via flexible endoscope for diagnosis of giardiasis in a dog. J.Am.Vet.Med.Assoc. 187: 162-163.
- Sloss, M. W., R. L. Kemp & A. M. Zajac. 1994. Veterinary clinical parasitology: fecal examination in the diagnosis of parasitism. A. Iowa State University Press, E.E.U.U.
- Tarabla, H. 2000. Epidemiología diagnóstica. Editorial Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Arg.
- Terán, M., & L. del Barrio. 2005. Salud pública e inocuidad de los alimentos en América Latina y el Caribe. [en línea]. I Global Feed & Food Congreso. July. 11-13. Sao Paulo, Bra. <http://www.fao.org/Regional/LAmerica/prensa/codees/pdf/global.pdf> (Consulta:23 ago.2005).
- Thompson, R. C. A., R. M. Hopkins & W. L. Homan. 2000. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. Parasitol Today. 16: 210-213.
- Thrusfield, M. 1990. Epidemiología veterinaria. Acribia, Zaragoza, España.
- Thrusfield, M., C. Ortega, C., I. de Blas, J. P. Noordhuizen & K. Frankena. 2001. Winepiscopo 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. Vet, Rec. 148: 567-572.

Win Episcopo. 2000. [CD ROM]. Versión 2.0. Universidad de Zaragoza. España.

Zajac, A. M. 1992. Giardiasis. Compend. Contin. Educ. Proc. Vet. 14: 604-611.

Zimmer, J. F. & D. B. Burrington. 1985. Comparison of four protocols for the treatment of canine giardiasis. J.A.A.H.A. 22: 168-172.

## 6. ANEXOS

### 6.1. Anexo 1 ficha de registro de las muestras fecales estudiadas.

# MUESTRA	FECHA RELOLECCION	REMITENTE	PACIENTE	EDAD
1	16- 03- 05	Veterinaria Vets	Leisy	2 meses
2	16-03-05	Dra. Valerín	Sussy	2 meses
3	17-03-05	Reino de Asís	Cookies	6 semanas
4	17-03-05	VEHASA	Shadow	5 meses
5	18-03- 05	Dra. Sojo	Soe	6 meses
6	19-03-05	Monte Villa	Boby	2 meses
7	20-03-05	Dr. Bruno	Pepe	4 meses
8	31-03-05	Veterinaria Vets	Rubí	3 meses
9	05-04-05	Dr. Starke	Sami	4 meses
10	05-04-05	Dr. Starke	Frida	2 meses
11	05-04-05	Dr. Starke	Kayar	3 meses
12	07-04-05	Dr. Starke	Cachorro	8 meses
13	07-04-05	Dra. Valerín	Nala	3 meses
14	08-04-05	Dra. Valerín	Sussy	4 meses
15	09-04-05	Reino de Asís	Maky	3 meses
16	09-04-05	Dr. Starke	Sasha	2 meses
17	09-04-05	Dr. Starke	Lupi	1 año

<b>18</b>	13-04-05	Dra. Sojo	Tai	<b>4 años</b>
<b>19</b>	13-04-05	Dra. Coto	Lulú	<b>8 meses</b>

<b># MUESTRA</b>	<b>FECHA RECOLECCION</b>	<b>REMITENTE</b>	<b>PACIENTE</b>	<b>EDAD</b>
<b>20</b>	13-04-05	Dr. Brenes	Ralfi	<b>1 año</b>
<b>21</b>	15-04-05	Dr. Stake	Jaco	<b>9 meses</b>
<b>22</b>	15-04-05	Dra. Sojo	Cuky	<b>6 meses</b>
<b>23</b>	15-04-05	Dra. Valerin	Kan	<b>11 meses</b>
<b>24</b>	16-04-05	Dr. Starke	Toto	<b>3 meses</b>
<b>25</b>	16-04-05	Dr. Stake	Puka	<b>2 meses</b>
<b>26</b>	20-04-05	Dr. Oreamuno	Nala	<b>6 meses</b>
<b>27</b>	20-04-05	VEHASA	Pinki	<b>2 meses</b>
<b>28</b>	20-04-05	Dra. Ana Isabel	Afro	<b>7 meses</b>
<b>29</b>	20-04-05	Dra. Retana	Nini	<b>2 meses</b>
<b>30</b>	21-04-05	Dra. Bonilla	Toby	<b>2 año</b>
<b>31</b>	23-04-05	Dr. Brenes	Firulais	<b>9 meses</b>
<b>32</b>	23-04-05	Univet	Luna	<b>4 meses</b>
<b>33</b>	26-04-05	Dr. Brenes	Onix	<b>3 meses</b>
<b>34</b>	27-04-05	Dr. Starke	Oso	<b>6 meses</b>
<b>35</b>	27-04-05	Reino Asís	Luky	<b>2 meses</b>
<b>36</b>	27-04-05	Dr. Brenes	Simba	<b>2 meses</b>
<b>37</b>	27-04-05	Dr. Starke	Moon	<b>3 meses</b>
<b>38</b>	27-04-05	Dr. Oreamuno	Perla	<b>1 año</b>
<b>39</b>	29-04-05	Dr. Stake	Luna	<b>1 año</b>

<b>40</b>	29-04-05	Monte Vida	Plux	<b>4 meses</b>
<b># MUESTRA</b>	<b>FECHA RECOLECCION</b>	<b>REMITENTE</b>	<b>PACIENTE</b>	<b>EDAD</b>
<b>41</b>	29-04-05	Dra. Sta Lucia	Camada	<b>2 meses</b>
<b>42</b>	30-04-05	Dr. Stake	Misha	<b>1 año</b>
<b>43</b>	03-05-05	Dra. Crespo	Pinto	<b>3 meses</b>
<b>44</b>	04-05-05	Rayma	Gaspar	<b>3 meses</b>
<b>45</b>	06-05-05	Dra. Valerin	Teo	<b>2 meses</b>
<b>46</b>	06-05-05	Rayma	Ginger	<b>4 años</b>
<b>47</b>	10-05-05	Dra. Bonilla	Enano	<b>4 meses</b>
<b>48</b>	12-05-05	Monte Villa	Lili	<b>3 meses</b>
<b>49</b>	13-05-05	Dr . Brenes	Gin	<b>7 años</b>
<b>50</b>	14-05-05	Dr. Chavarría	Axel	<b>5 años</b>
<b>51</b>	17-05-05	Propet Belén	Sammy	<b>9 meses</b>
<b>52</b>	17-05-05	Spa de Mascotas	Negro	<b>9 meses</b>
<b>53</b>	18-05-05	Reino de Asis	Paquito	<b>1 año</b>
<b>54</b>	19-05-05	Dr. Molina	Sammy	<b>10 meses</b>
<b>55</b>	19-05-05	Dr. Brenes	Ali	<b>4 años</b>
<b>56</b>	20-05-05	Pet Star	Ronco	<b>4 meses</b>
<b>57</b>	21-05-05	VEHASA	Camila	<b>4 meses</b>
<b>58</b>	21-05-05	VEHASA	Don Omar	<b>2 meses</b>
<b>59</b>	21-05-05	Dr. Starke	Kivi	<b>5 meses</b>
<b>60</b>	28-05- 05	Dr. Starke	Babú	<b>3 meses</b>
<b># MUESTRA</b>	<b>FECHA RECOLECCION</b>	<b>REMITENTE</b>	<b>PACIENTE</b>	<b>EDAD</b>

<b>61</b>	28-05-05	Rayma	Scoti	<b>4 meses</b>
<b>62</b>	28-05-05	Dr. Starke	Sisi	<b>4 meses</b>
<b>63</b>	31-05-05	Dr. Brenes	Dana	<b>2 años</b>
<b>64</b>	31-05-05	Dr. Brenes	Tofy	<b>2 años</b>
<b>65</b>	01-06-05	Dr. Starke	Kiki	<b>7 meses</b>
<b>66</b>	02-06-05	Dr. Oreamuno	Cleo	<b>4 meses</b>
<b>67</b>	02-06-05	Dra. Sojo	Goban	<b>2 años</b>
<b>68</b>	03-06-05	Dr. Starke	Camada	<b>3 meses</b>
<b>69</b>	04-06-05	Dr. Starke	Roxy	<b>4 meses</b>
<b>70</b>	07-06-05	Dr. Starke	Lia	<b>2 meses</b>
<b>71</b>	07-06-05	Dr. Oreamuno	Cotton	<b>4 meses</b>
<b>72</b>	07-06-05	Dr. Molina	Lea	<b>3 meses</b>
<b>73</b>	08-06-05	Dr. Molina	Aldo	<b>5 meses</b>
<b>74</b>	08-06-05	Dr. Starke	Nani	<b>1 año</b>
<b>75</b>	08-06-05	Dra. Sojo	Rambo	<b>2 años</b>
<b>76</b>	09-06-05	Dr. Brenes	Pepe	<b>8 meses</b>
<b>77</b>	09-06-05	Dr. Bruno	Lindo	<b>1 año</b>
<b>78</b>	09-06-05	Dr. Starke	Barú	<b>4 meses</b>
<b>79</b>	09-06-05	Dra. Crespo	Lila	<b>6 meses</b>
<b>80</b>	09-06-05	Dr. Molina	Dosty	<b>2 meses</b>
<b># MUESTRA</b>	<b>FECHA RECOLECCION</b>	<b>REMITENTE</b>	<b>PACIENTE</b>	<b>EDAD</b>
<b>81</b>	18-06-05	Dra. Crespo	Tamy	<b>2 meses</b>
<b>82</b>	18-06-05	Dr. Brenes	Carlota	<b>1 año</b>

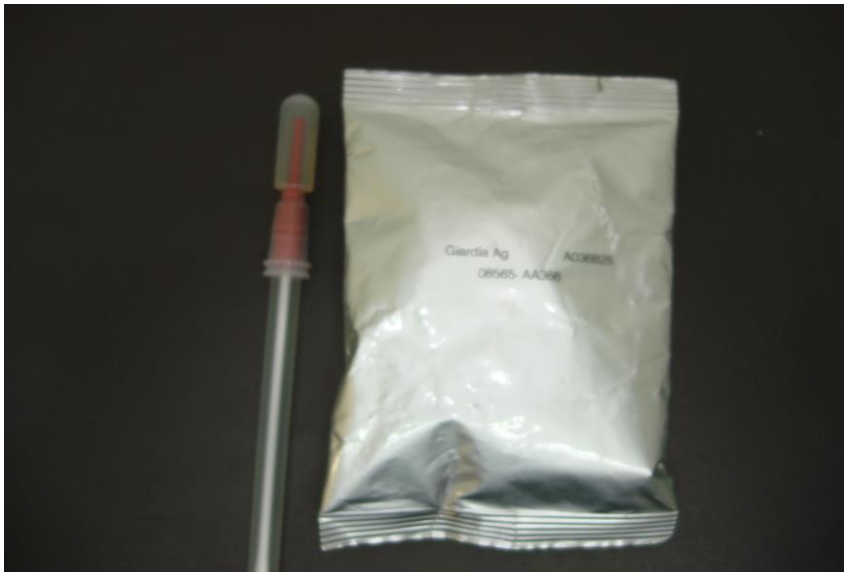
83	18-06-05	Dr. Brenes	Daisy	4 meses
84	18-06-05	Dr. Oreamuno	Snoopy	4 años
85	19-06-05	Rayma	Tito	2 meses
86	19-06-05	Veterinaria Vets	Thai	6 meses
87	22-06-05	Dr. Starke	Venecia	8 meses
88	22-06-05	Dra. Valerín	Cleo	3 meses
89	22-06-05	Dra. Sojo	Ramiro	5 años
90	22-06-05	Dra. Crespo	Michu	2 años
91	25-06-05	Vehasa	Nala	4 meses
92	25-06-05	Reino Asís	Paco	2 meses
93	25-06-05	Dra. Crespo	Leo	7 meses
94	25-06-05	Dra. Crespo	Sebas	8 meses
95	25-06-05	Dr. Brenes	Remo	2 meses
96	29-06-05	Dra. Coto	Mindy	1 año
97	01-07-05	Dr. Molina	Celeste	3 meses
98	01-07-05	Dra. Soja	Tuti	5 meses
99	06-07-05	Vehasa	Fiky	4 meses
100	06-07-05	Dr. Starke	Yoyo	5 meses
<b># MUESTRA</b>	<b>FECHA RECOLECCION</b>	<b>REMITENTE</b>	<b>PACIENTE</b>	<b>EDAD</b>
101	14-07-05	Dr. Brenes	Lulú	1 año
102	14-07-05	Dr. Brenes	Frida	4 años
103	17-07-05	Dra. Crespo	Lobo	2 meses
104	17-07-05	Dr. Oreamuno	Chispa	3 meses



<b>105</b>	20-07-05	Dr. Starke	Shrek	<b>7 meses</b>
<b>106</b>	23-07-05	Dr. Molina	Nieve	<b>4 años</b>
<b>107</b>	29-07-05	Vehasa	Chalupa	<b>3 meses</b>
<b>108</b>	03-08-05	Veterinaria Vets	Pinto	<b>6 meses</b>
<b>109</b>	03-08-05	Reino Asís	Yiyo	<b>3 años</b>
<b>110</b>	03-08-05	Rayma	Milú	<b>7 meses</b>
<b>111</b>	07-08-05	Dra. Valerín	Sisi	<b>4 meses</b>
<b>112</b>	13-08-05	Dr. Brenes	Nemo	<b>2 meses</b>
<b>113</b>	23-08-05	Dr. Brenes	Campanita	<b>7 meses</b>
<b>114</b>	23-08-05	Dr. Crespo	Rex	<b>6 años</b>
<b>115</b>	26-08-05	Dr. Molina	Dona	<b>5 meses</b>

6.2. Anexo 2 procedimiento para utilizar el SNAP *Giardia* Test Kit de laboratorios IDEXX

®



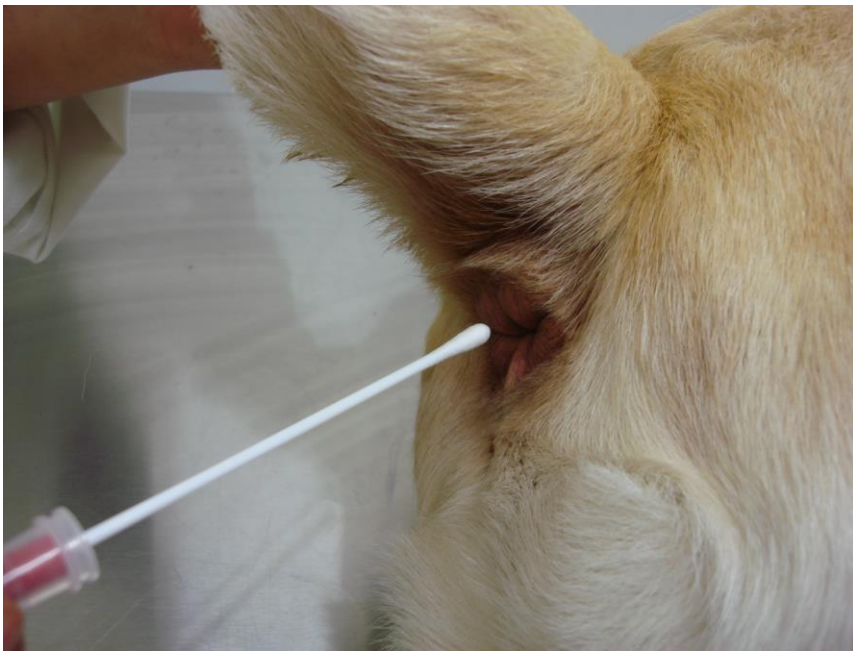
Presentación por unidad del SNAP *Giardia* Test Kit



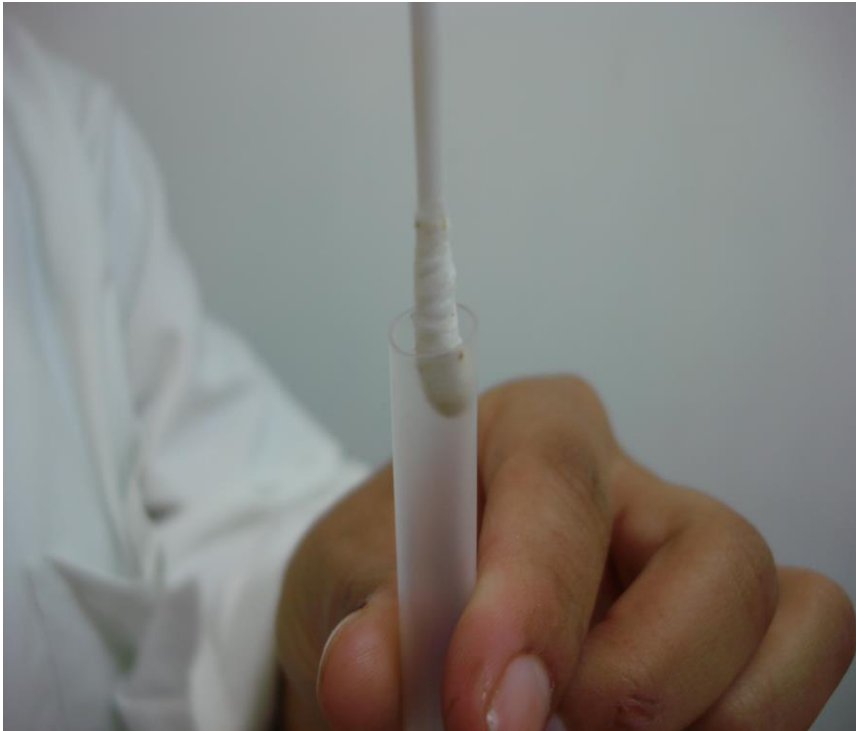
Componentes del SNAP *Giardia* Test Kit



Exposición del hisopo



Toma de muestra



Introducción del hisopo con la muestra



Rompimiento del sello del bulbo



Oprimir 3 veces el bulbo para mezclar el conjugado con la muestra



Mezcla del conjugado con la muestra



Deposición de la muestra al pozo del kit

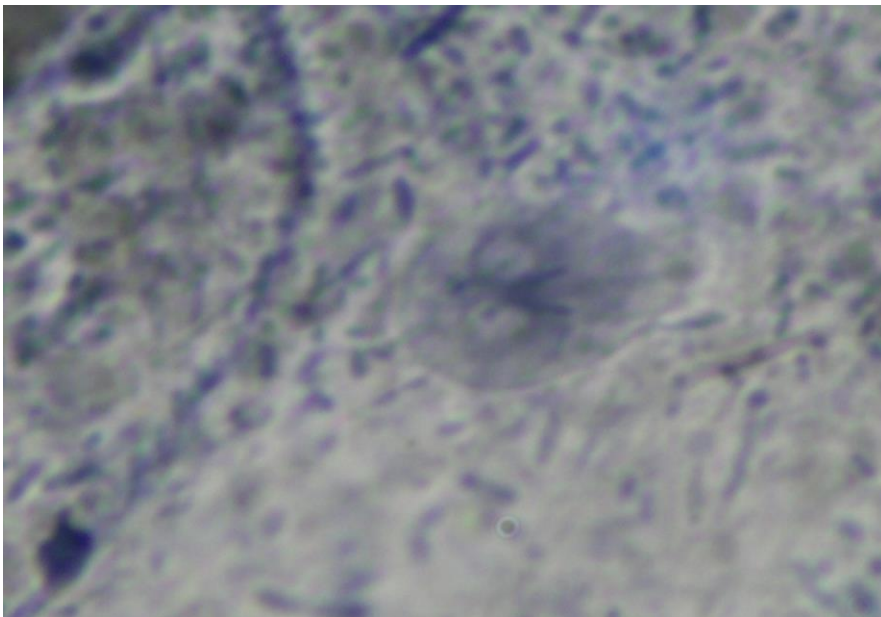


Activación y lectura de resultados del kit.

6.3. Anexo 3 imagen del trofozito y quiste de *Giardia spp.*, visualizados con la tinción de hematoxilina férrica de Heindenhein.



Quiste de *Giardia* spp.



Trofozoíto de *Giardia* spp.