

# Evaluation und Vergleich von zwei immunchromatographischen Kassetten Triple-Tests

für die zeitgleiche Detektion von *Cryptosporidium* spp.; *Giardia lamblia* und *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* Antigenen in humanen Stuhlproben

Ferse, M.<sup>1</sup>; Njul, S. <sup>1</sup>; Bartholomé, E. <sup>2</sup>; Scheid, P.<sup>1</sup>, Koblenz/Köln

## Zusammenfassung

Der Einsatz von immunchromatographischen Schnelltests in der Med. Parasitologie, zusätzlich zur mikroskopischen Diagnostik, stellt eine einfache, schnelle und sichere Methode für die gleichzeitige Erkennung von *Giardia lamblia*, *E. histolytica/dispar* und *Cryptosporidium parvum* – spezifischen Antigenen in unfixierten Stuhlproben humanen Ursprungs dar. In der vorliegenden Untersuchung erfolgte eine vergleichende, methodische Validierung der Schnelltestsysteme des RIDA® Quick *Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba combi* der Firma R-Biopharm und des Triage® Micro Parasite Panel der Firma BIOSITE Diagnostics im Hinblick auf den Gebrauch in den mikrobiologischen Einsatzlaboratorien der Bundeswehr. Neben Sensitivität und Spezifität wurden auch Parameter wie Handhabung, Kosten, Haltbarkeit und Praktikabilität unter besonderen Bedingungen bewertet.

**Schlüsselwörter:** Parasitologie, Schnelltestsysteme, parasitäre Protozoen

## Abstract

The application of Immunochromatographic rapid test in the laboratory of medical parasitology, in addition to the microscopic diagnosis, represents a simple, fast and secure method for the simultaneous detection of *Giardia lamblia*, *E. histolytica/dispar*, and *Cryptosporidium parvum* – specific antigens in unfixed stool samples of human origin. In the present study a comparative, methodical validation of rapid test systems of RIDA® quick *Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba combi* (R-Biopharm) and the Triage® Micro Parasite Panel (BIOSITE Diagnostics) was performed, with regard to the use within the microbiological field laboratories. In addition to sensitivity and specificity, other parameters such as handling, cost, durability and practicability under special conditions have been assessed as well.

**Keywords:** Parasitology, rapid test systems, parasitic protozoa

## Einleitung

*Giardia lamblia* und *Entamoeba histolytica* sowie Kryptosporidien gehören zu den Erregern, die weltweit am häufigsten bei parasitären Erkrankungen des Intestinaltrakts nachgewiesen werden. Es sind gerade diese parasitären Protozoen, die sowohl akute als auch chronische Verläufe induzieren können und auch zu Ausbrüchen führen können (Okhuysen 2001; Scheid et al. 2005). Insbesondere bei Aufenthalt in Endemiegebieten kann es während des Aufenthaltes oder nach einer entsprechenden Reise zu Gesundheitsstörungen, ausgelöst durch einen der Parasiten oder auch mehrere gleichzeitig, kommen (Nothdurft et al. 1992).

Die *Giardiasis* ist eine nach IFSG meldepflichtige parasitäre Erkrankung, die durch

den protozoischen Parasiten *Giardia lamblia* (Abb. 1) verursacht wird (Scheid 2004). Die Übertragung erfolgt vor allem über Nahrungsmittel oder (Trink-) Wasser. Innerhalb von ein bis drei Tagen können plötzlich einsetzende explosionsartige, wässrige, gelbe, übelriechende Durchfälle, Bauchkrämpfe, Anorexie, Übelkeit und Erbrechen als Symptome auftreten. Zahlreiche Studien belegen die Nachweisraten von *Giardia lamblia* bis zu 18 % bei symptomatischen Tropenrückkehrern (Weinke et al. 1998; Eckert et al. 1990). Eine chronische *Giardiasis* kann zu einem Malabsorptionssyndrom führen und insbesondere bei Immunsupprimierten schwere Verläufe induzieren (Mehlhorn 2012; Stark et al. 2009).

Die Ruhramöbe *Entamoeba histolytica* (Abb. 2) ist von der apathogenen Art

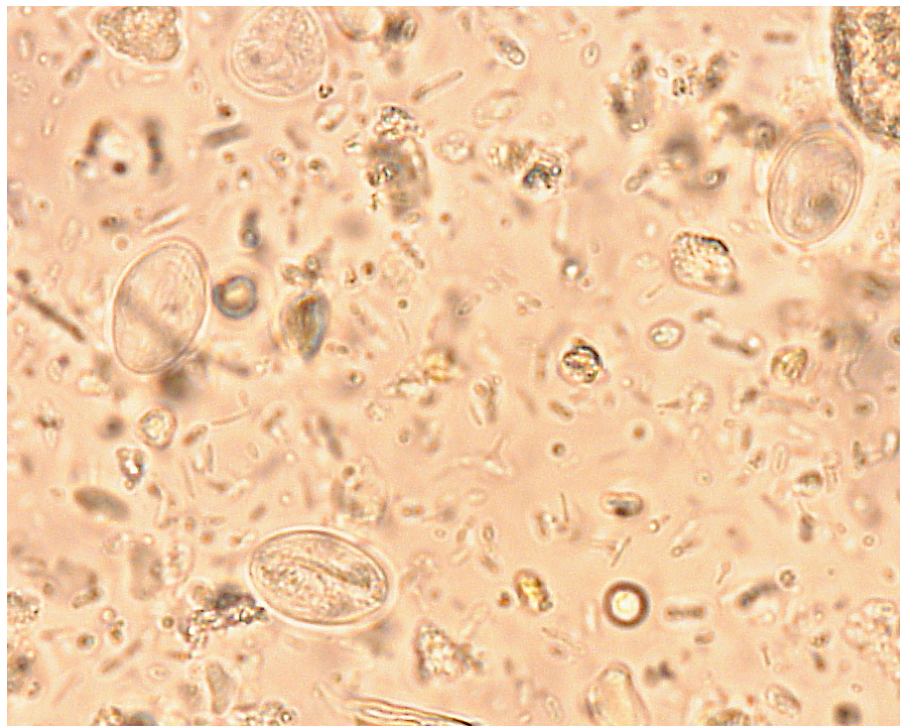


Abb. 1: *Giardia lamblia* Zysten in angereichertem Stuhl (MIFC; Größe der Zysten: 13µm)

*Entamoeba dispar* mikroskopisch schwer zu unterscheiden (Weinke et al. 1998; Scheid 2011). Bei einer Infektion mit *Entamoeba histolytica* liegt der Krankheitsausbruch im akuten Fall etwa drei bis zehn Tage nach der Infektion. Die Inkubationszeit kann jedoch auch länger dauern, d. h. auch noch Monate nach einer Reise können sich die Symptome zeigen. Wird die Erkrankung nicht behandelt, kann es zu den Manifestationsformen der Amöbenruhr (intestinal) und des Amöbenleberabszesses (extraintestinal) kommen (Scheid 2011).

Einige Kryptosporidienarten (Abb. 3) können beim Menschen eine akute Enterokolitis verursachen. In der Regel kommt es bei immunologisch gesunden Menschen innerhalb von zehn bis 30 Tagen zu einem Rückgang der Symptomatik. Bei immunsupprimierten Personen, insbesondere AIDS-Patienten, persistiert der Parasit, und die Erkrankung hat einen langen und zum Teil fulminanten klinischen Verlauf bis hin zu letalen Ausgängen (Scheid 2013a). Eine schnelle und sichere Diagnostik ist daher essentiell (Mehlhorn 2012).

Der Einsatz von immunchromatographischen Dreifach-Schnelltests, zusätzlich zur mikroskopischen Diagnostik, stellt eine einfache, schnelle und additive Methode für die gleichzeitige Erkennung von *Giardia lamblia*, *E. histolytica/dispar*, und Kryptosporidien – spezifischen Antigenen in Stuhlproben humanen Ursprungs dar.

Die Durchführung ist in der Regel einfach, benötigt geringe Übung und kann sowohl in der Individualdiagnostik als auch zum zeitnahen Screening angewendet werden. Während Antigen-Einzeltests in zahlreichen Studien miteinander verglichen worden sind, gibt es nur wenige Vergleichsstudien der Triple-Tests untereinander (Weitzel et al. 2006). Es konnte jedoch bereits belegt werden, dass die Leistungsfähigkeit der Triple-Tests im direkten Vergleich nicht schlechter war als die der Einzel-Antigenteste (Goni et al. 2012).

## Militärmedizinischer Bezug

Bei einer Auslandsverwendung in warmen Ländern besteht stets eine erhöhte Exposition gegenüber parasitären Erregern, die zu akuten aber auch chronischen Infektionen bei den in Endemiegebieten stationierten Soldaten führen können. Daher ist auf dem Gebiet der Medizinischen Parasitologie ein hohes Aufkommen an Proben zu erwarten, die auf Parasiten (Helminthen und Protozoen) zu untersuchen sind.

Die Konzeption der Mikrobiologischen Einsatzlaboratorien im Sanitätsdienst der Bundeswehr trägt diesem Umstand Rechnung. In ihnen wird die Aufgabe der kli-

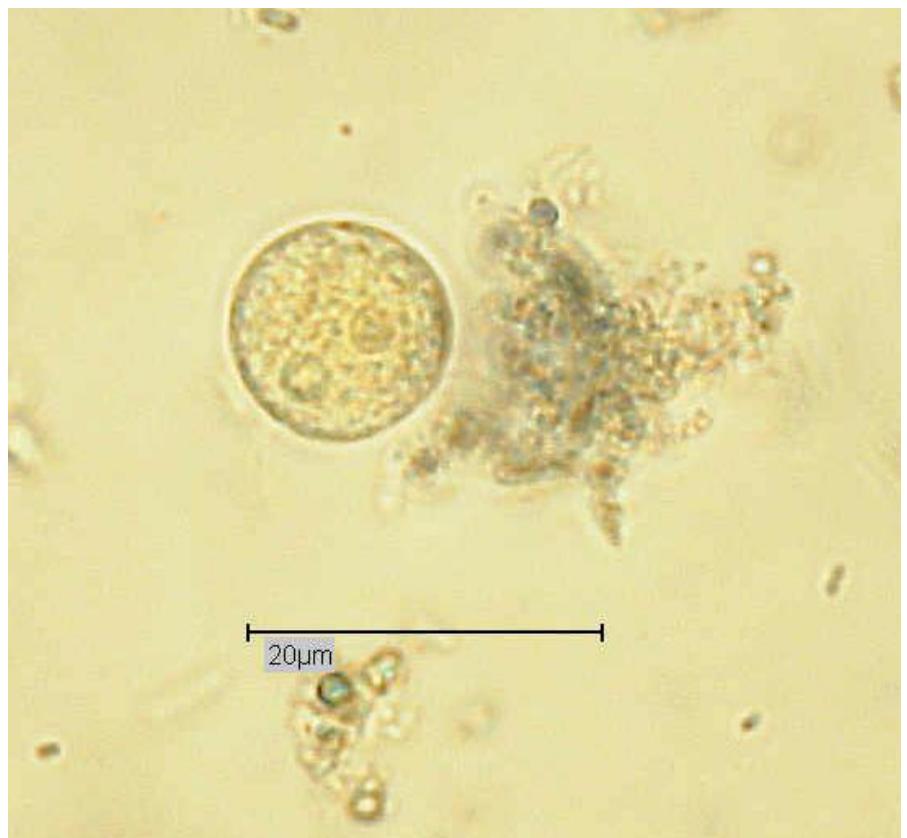


Abb. 2: *Entamoeba histolytica* Zyste in angereichertem Stuhl (MIFC; Größe der Zyste: 14µm)

nisch-mikrobiologischen Diagnostik für ambulante und stationäre Patienten im Einsatzgebiet als auch die Bereitstellung epidemiologisch relevanter Befunde sichergestellt. Die medizinisch-mikrobiologische Diagnostik folgt meist einem abgestuften Prozess, der in einer ersten Stufe (Screening) einfache Suchtests und orientierende Verfahren einsetzt und – falls erforderlich – mit der Bestätigung und weiterführenden Diagnostik abgeschlossen wird. Dabei wendet das Personal des mikrobiologischen Einsatzlabors feldtaugliche und schnelle Verfahren (z. B. Such-Tests) an. Die Mikroskopie als Screening- und Standardverfahren (und oft „Goldstandard“) ist essentiell aber zeitaufwändig und erfordert eine große fachliche Erfahrung des eingesetzten Personals. Zudem sind die Sensitivitätswerte von weiteren Parametern abhängig, wie beispielsweise der Untersuchung von mehreren Stühlen des gleichen Patienten. Die Verwendung von Screeningtests in diesem Bereich kann den „workload“ erheblich senken, allerdings nur bei hoher Empfindlichkeit und ausreichender Spezifität und nur dann, wenn alle Parasiten erfasst werden können, deren Diagnose z. B. wegen akuter Behandlungsbedürftigkeit sowie der Einleitung von Maßnahmen zur Infektkettenunterbrechung zeitkritisch ist. Die Schnellteste dienen also zur Ergänzung der Diagnose wichtiger intestinaler Pa-

rasitosen und helfen insbesondere weniger erfahrenem Personal in den Einsatzlaboratorien. Auch zur Bestätigung lichtmikroskopisch erhaltener Ergebnisse finden solche Schnelltests Anwendung. Alle übrigen Befunde werden dann durch den Versand des Materials in einem Transportmedium mit Fixativ im rückwärtigen Leitinstitut durch fachlich qualifiziertes Personal standardisiert erhoben (bereits etabliert; Scheid und Over 2007).

Alternativ wird für den diagnostischen Prozess die Teleparasitologie genutzt, die eine Übertragung qualitativ hochwertiger statischer Bilder von mikroskopischen Präparaten ermöglicht und durch die telemedizinische Einbeziehung des Experten die diagnostische Spezifität durch Vermeidung falsch-positiver Befunde verbessert (Scheid 2013b).

## Material und Methoden

### 1. Testsysteme

In der vorliegenden vergleichenden Analyse wurden zwei Schnelltests zur Detektion von Protozoen untersucht und einander gegenübergestellt. Hierfür werden sowohl sogenannte „hard factors“ wie Sensitivität/Spezifität oder Haltbarkeit herangezogen als auch „soft factors“ wie Praktikabilität und

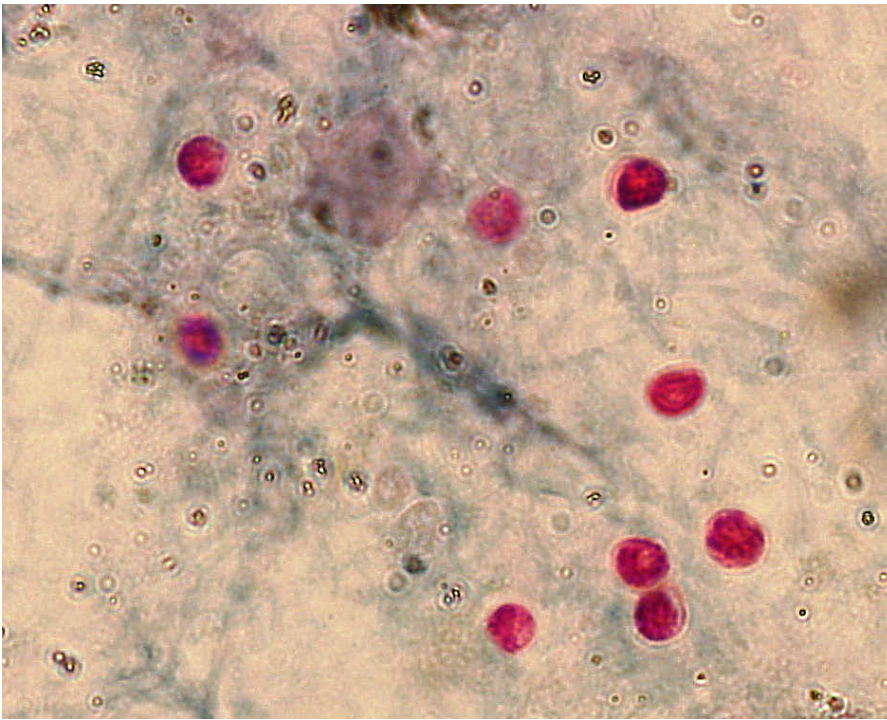


Abb. 3: *Cryptosporidium parvum* Oozysten in Stuhl (Kinyoun-Färbung; Größe der Oozysten: 4µm)

die Einschätzungen der Handhabung durch diverse Anwender, auch vor Ort in einem Einsatzlabor. Bei beiden Tests handelt es sich um immunchromatographische Kassetten zur Bestimmung der Antigene der drei relevanten, akute Krankheitssymptome hervorrufenden Protozoen (*Giardia lamblia*, *E. histolytica/dispar* und *Cryptosporidium parvum*) in nativen Stuhlproben. In beiden Systemen werden die Antigene für die drei Parasiten in der Stuhlprobe isoliert und mit spezifischen Antikörpern auf einer Membran immobilisiert. Mittels makroskopisch sichtbaren Banden kann das Ergebnis ohne weitere Hilfsmittel abgelesen werden. Das Triage® Micro Parasite Panel der Firma BIOSITE Diagnostics wurde bereits intern im Labor für Med. Parasitologie orientierend gegen die Mikroskopie validiert. Der alternative, in dieser Studie zu vergleichende Test trägt die Bezeichnung RIDA® Quick Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba combi (Firma R-Biopharm).

## 2. Durchführung und Probenmaterial

Über einen Zeitraum von fünf Monaten wurde im Labor für Medizinische Parasitologie am Zentralen Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr in Koblenz parallel zur Routinediagnostik eine Studie mit insgesamt 80 nativen Stuhlproben aus der Routinediagnostik durchgeführt. Ein Teil der Untersuchungsergebnisse (z. B. Handhabung) wurde im mikrobiologischen Einsatzlabor der Bundes-

wehr am Standort Prizren im Kosovo gewonnen. Verglichen wurden dabei die beiden Tests „RIDA® Quick Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi“ (folgend RIDA Quick) und „Triage® Micro Parasite Panel“ (folgend Triage) gegen den Goldstandard Mikroskopie von Anreicherungspräparaten nach dem Sedimentationsverfahren (hier: MIF-Verfahren bzw. Verwendung des ParasiTrap® Diagnostik Systems (Fa. Biosepar)). Die detaillierte Beschreibung der Tests findet sich der Übersicht halber in dem einführenden Kapitel des Ergebnis/Diskussions-Teils.

Die Proben stammten aus der Routine-Diagnostik von Patienten ohne spezifische Symptome (Auslandsrückkehrer) sowie von Patienten mit intestinalen Beschwerden. Die mikroskopische Untersuchung (als Goldstandard) sowie die Durchführung der Tests erfolgte durch erfahrenes Laborpersonal, in der Regel von den Medizinisch-technischen

Laboratoriumsassistenten und dem Medizinischen Parasitologen.

Es wurden Stuhlproben von insgesamt 80 Patienten (n=80) getestet, die mikroskopisch wie folgt befundet wurden:

- 14x *Giardia lamblia* positiv,
- 3x *Giardia lamblia* positiv & *Entamoeba coli* positiv
- 6x *Entamoeba histolytica/dispar* positiv,
- 10x *Cryptosporidium* sp. positiv, sowie eine Emulsion mit aufgereinigten *Cryptosporidium parvum*-Zysten,
- 3x *Entamoeba coli* positiv,
- 3x *Endolimax nana* positiv & *Blastocystis* sp. positiv
- 1x *Chilomastix mesnili* positiv
- 40 kein Nachweis von intestinalen Parasiten (ohne Befund).

Da die beiden Schnelltests die Antigene nur dreier Protozoen detektieren, wurden Testergebnisse für die übrigen intestinalen Protozoen als richtig-negatives Ergebnis gewertet (also bei sieben Proben). Die lichtmikroskopische Mikroskopie nach Anreicherung (Sedimentationsverfahren) und Färbung (Lugol-Färbung bei allen Proben, Kinyoun-Färbung bei Verdacht auf Kryptosporidien) diente als Vergleichsmethode (Scheid 2004; Mehlhorn 2012).

## 3. Statistische Methoden

Zur Auswertung der Testergebnisse wurden verschiedene statistische Testverfahren herangezogen.

Auf Basis der erhaltenen Daten wurde zunächst der McNemar-Test für einen ersten übersichtlichen Vergleich der beiden Testsysteme gegenüber dem derzeitigen Goldstandard, der Mikroskopie, durchgeführt (Tab. 1). Der McNemar-Test ist ein vergleichender Häufigkeitstest für zwei verbundene Stichproben, der mit einer Vierfeldertafel visualisiert wird (Weiß 2013).

Hier entsprechen die Werte für (a+c) der Anzahl richtig-positiver Ergebnisse und für (b+d) den richtig-negativen Werten. Mit diesem Wissen sind des Weiteren Aussagen über die Spezifität mit  $d/(b+d)$  und die

Tabelle 1: Grundaufbau einer Vierfeldertafel des McNemar-Tests zur Untersuchung verbundener Stichproben.

		Goldstandard		
		Positiv	Negativ	
Vergleichstest	Positiv	a	b	a+b
	Negativ	c	d	c+d
		a+c	b+d	N

Sensitivität  $a/(a+c)$  möglich (Hess et al. 2012).

Um Rückschlüsse auf die *a priori*-Wahrscheinlichkeit und die *a posteriori*-Wahrscheinlichkeit ziehen zu können, erfolgten Berechnungen unter Zuhilfenahme des Bayes-Theorems. Nachfolgend ist die allgemeine Form des Bayes-Theorems kurz dargestellt (Weiß 2013).

$$P(A|B) = \frac{P(A) * P(B|A)}{P(A) * P(B|A) + P(\bar{A}) * P(B|\bar{A})}$$

„Wenn A das Ereignis »Vorliegen eines bestimmten Erregers« symbolisiert und B das Ereignis »Testergebnis positiv«, lässt sich [mit dem Bayes-Theorem] die Wahrscheinlichkeit  $P(A|B)$  berechnen, mit der ein Patient mit diesem Erreger erkrankt ist, falls der Testbefund positiv ist.“ (Weiß 2013).

**Ergebnisse und Diskussion**

**Triage® Micro Parasite Panel der Firma BIOSITE Diagnostics:**

Die Firma Biosite Diagnostics (San Diego, USA) bietet unter dem Handelsnamen Triage® Micro Parasite Panel einen Schnelltest zum Nachweis von *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/dispar* und *Cryptosporidium parvum* im Nativstuhl an (Abb. 4).

**Testprinzip:** Es handelt sich um einen immunchromatographischen Enzym-Immunoassay zur Bestimmung von Antigenen der drei o.g. intestinalen Protozoen in frischen oder frisch gefrorenen Stuhlproben menschlichen Ursprungs. Antigene für die drei Parasiten (-gruppen) in der Stuhlprobe werden isoliert und mit spezifischen Antikörpern auf einer Membran immobilisiert. Die immobilisierten Antigene werden mit Hilfe spezifischer Antikörper-Enzymkonjugate detektiert. Die spezifische Bindung der Antigene wird, nach Waschstritten mit Hilfe einer Substratreaktion, anhand daraus resultierender einfarbiger, purpur-schwarzer Banden visualisiert.

**Handhabung:** Im Labor für Medizinische Parasitologie des Zentralen Instituts des Sanitätsdienstes der Bundeswehr in Koblenz wurde der Test zehn Jahre lang parallel zum Einsatz in den Einsatzlaboratorien genutzt und somit ständig im Hinblick auf die Verwendung in den Einsatzlaboratorien mitvalidiert und überprüft, um Erfahrungen in der täglichen, praktischen Handhabung zu gewinnen. Die Triage-Testkits enthalten alle zur Bestimmung und Identifikation von Antigenen für die drei Parasiten erforderlichen Reagenzien in ausreichender Menge. Das mitgelieferte Material umfasst die komplette Testausrüstung, von den Probenröhrchen bis zu den Reagenzien.

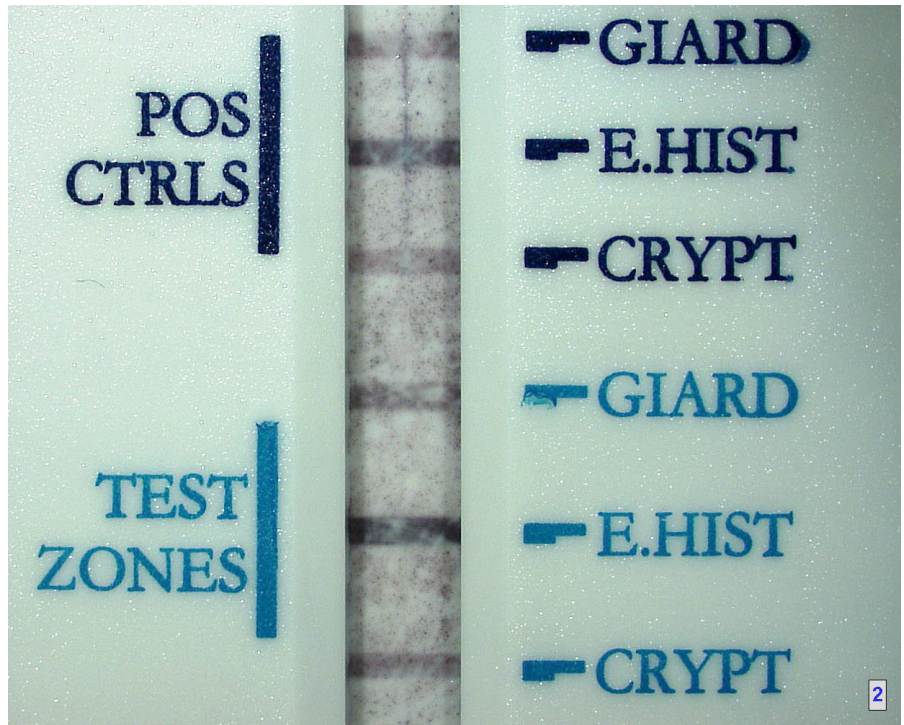


Abb. 4: Testfeld des Triage® Micro Parasite Panel; hier: valide und positiv für die drei Protozoenantigene

Lediglich ein Labormischer (Vortexer) sowie eine Zentrifuge sind zur Testanwendung additiv erforderlich. Die Gesamtzeit der Versuchsdurchführung beträgt ca. 15 Minuten, zusätzlich der Zeit, die benötigt wird, um die Materialien auf Zimmertemperatur zu bringen, die zuvor im Kühlschrank bei 5°C gelagert wurden. Die Ergebnisse lassen sich nach der Testdurchführung nach weiteren ca. fünf Minuten für die oben beschriebenen intesti-

naln Protozoen ablesen. So werden ca. 50 Minuten für die Testvorbereitung und die Testdurchführung erreicht. Allerdings verfärbt sich das Ergebnisfeld anschließend binnen fünf bis 15 Minuten, die Banden sind nach dieser Zeit dann nicht mehr zu erkennen. Der Test ist einfach handhabbar. Alle Mitarbeiter beherrschten die Testdurchführung anhand der mitgelieferten Bedienungsanleitung sehr schnell und korrekt.

Tabelle 2: McNemar-Test mit dem Vergleich der Mikroskopischen Analyse und dem RIDA-Test. Die Probengröße betrug N=80 Proben

		Mikroskopische Analyse		
		Positiv	Negativ	
Ergebnis RIDA Quick	Positiv	33	0	33
	Negativ	0	47	47
		33	47	80

Tabelle 3: McNemar-Test mit dem Vergleich der Mikroskopischen Analyse und dem Triage-Test. Die Probengröße betrug N=77 Proben, da drei der Triage-Tests als nicht auswertbar deklariert werden mussten

		Mikroskopische Analyse		
		Positiv	Negativ	
Ergebnis Triage	Positiv	26	0	26
	Negativ	5	46	51
		31	46	77



Abb. 5: Testkassette des RIDA® Quick Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba combi; hier: valide und positiv für *Giardia lamblia*

**Kosten:** Der Kostenaufwand beträgt etwa das Dreifache des Vergleichstests, wobei alle Chemikalien, Röhrchen und sonstige Materialien bereits berücksichtigt sind. Kosten im Personalbereich sowie andere „soft factors“, die sich durch Zeitersparnis etc. ergeben, werden hier nicht berücksichtigt.

**Haltbarkeit:** Die Haltbarkeit des Testes wird limitiert durch die Haltbarkeit des Enzymkonjugates. Sie beträgt maximal zwei bis drei Monate, wobei diese bei einem Screening bzw. bei einer Probenmenge wie sie im Labor für Medizinische Parasitologie des ZlnstSanBw KOB vorliegt und wie sie für den Einsatz in den Einsatzlaboratorien eingeschätzt wird, nie zu einem (zeitlichen) Problem wird.

#### RIDA® Quick Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba combi der Firma R-Biopharm:

Die Firma R-Biopharm AG (Darmstadt, Deutschland) bietet als sogenannten Lateral-Flow Test den RIDA® Quick Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba combi zum simultanen, qualitativen Nachweis von *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* und *Entamoeba histolytica/dispar* in nativem Stuhl an (Abb. 5).

**Testprinzip:** Es handelt sich ebenfalls um einen immunochromatographischen Schnelltest zum Nachweis von Antigenen der drei genannten Protozoen. Das Vorhandensein spezifischer Antigene wird anhand einer oder mehrerer farbiger Banden neben dem auf der Testkassette aufgedruckten Kürzeln visuell bestimmt. Die Bandenbildung entsteht im positiven Fall durch die Bindung von Antigenen der entsprechenden Parasiten an mit Latexpartikeln markierte, spezifische Antikörper. Dieser farblich markierte Antigen-Antikörper Komplex bindet sich wiederum an fixierte spezifische Antikörper im Testfeld.

**Handhabung:** Der RIDA® Quick Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba combi-Test beinhaltet alle zur Bestimmung und Identifikation von Antigenen für die drei Parasiten (-gruppen) erforderlichen Reagenzien in ausreichender Menge. Das mitgelieferte

Material umfasst die komplette Testausstattung, ausgenommen der Probenröhrchen. Optional kann ein Labormischer („Vortexer“) eingesetzt werden, der jedoch keine Voraussetzung ist. Die reine Dauer der Versuchsdurchführung beträgt (wenn die Reagenzien bei Raumtemperatur gelagert wurden) fünf Minuten. Die Ergebnisse können nach weiteren zehn Minuten abgelesen werden, eine Kontrollbande dient der internen Qualitätskontrolle. Die Ergebnisbanden sind auch noch Wochen später eindeutig zu erkennen.

**Kosten:** Die Kosten belaufen sich auf ein Drittel des Vergleichstests. Kosten im Personalbereich sowie andere „soft factors“, die sich durch Zeitersparnis etc. ergeben, werden hier nicht berücksichtigt.

**Haltbarkeit:** Die Haltbarkeit entspricht den Herstellerangaben des Packungsdruckes. Die Materialien können sowohl im Kühlschrank wie auch bei Raumtemperatur für etwa 18 Monate gelagert werden.

#### Statistische Auswertung der Ergebnisse

Im Rahmen der Studie war der Triage-Test in drei Fällen nicht auswertbar, da sich das Ablesefeld während der Testphase derart verfärbte, dass einzelne Banden hierin nicht mehr zu erkennen waren. Diese Tests mussten somit wiederholt werden.

In Packungen des RIDA Quick-Tests mit der Chargen-Nr. AM24 befanden sich insgesamt vier falsche Testkassetten. Auf den ersten Blick glichen sie den anderen Testkassetten, jedoch war am Rande des Testfelds nicht „C 3 2 1“ sondern „C T2 T1“ eingraviert. Es handelte sich also um den „Deckel“ des Duo-Tests, der lediglich zwei der drei Parameter (also Erregerantigene) zeitgleich nachweist. Der Teststreifen gehörte jedoch zum Triple-Test.

Der in Tabelle 1 visualisierte McNemar-Test wurde in Tabelle 2 (RIDA Quick) und Tabelle 3 (Triage) bestimmt. Als Goldstandard wurden die Ergebnisse mit der lichtmikroskopischen Analyse nach Anreicherung und Färbung (Lugol- bzw. Kinyounfärbung) verglichen.

Aus den obigen Tabellen lassen sich leicht und übersichtlich erste Schlüsse über die Zuverlässigkeit der Testsysteme ziehen. So zeigt der RIDA Quick-Test (Tabelle 2) keine Abweichungen von den Ergebnissen der mikroskopischen Analyse (33 positive Proben gegenüber 47 negativen Proben). Hingegen ergab der Triage-Test insgesamt fünfmal ein falsch-negatives Ergebnis.

Anhand des McNemar-Tests lassen sich die allgemeinen Werte der Sensitivität und der Spezifität bestimmen. Die Sensitivität bezeichnet die bedingte Wahrscheinlichkeit für ein richtig-positives Ereignis, die Spezifität die

Tabelle 4: Ergebnisse der Testung durch die Schnelltests RIDA® Quick Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba combi und Triage® Micro Parasite Panel. Die Werte sind prozentual angegeben

Protozoen	RIDA® Quick C./G./E. combi			Triage® Micro Parasite Panel		
	Prävalenz	Sensitivität	Spezifität	Prävalenz	Sensitivität	Spezifität
<i>Giardia lamblia</i>	21,3%	100%	100%	22,1%	77%	100%
<i>Cryptosporidium parvum</i>	12,5%	100%	100%	10,4%	87,5%	100%
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	7,5%	100%	100%	7,8%	100%	100%
Σ genannte Protozoen	41,25%	100%	100%	40,26%	83,87%	100%

Wahrscheinlichkeit für ein richtig-negatives Ergebnis.

Aus den Tabellen folgen somit:

Sensitivität (RIDA Quick):  $33/33 = 100\%$   
 Spezifität (RIDA Quick):  $47/47 = 100\%$   
 Sensitivität (Triage):  $26/31 = 83,87\%$   
 Spezifität (Triage):  $46/46 = 100\%$

In Tabelle 4 sind die Testergebnisse aufgeschlüsselt nach den untersuchten Protozoen dargestellt. Die Werte der Prävalenz, Sensitivität und Spezifität sind prozentual angegeben und ermöglichen einen dezidierten Vergleich der Validität der Testsysteme. Die Werte der Prävalenz sind hier als Marker für den Anteil der erkrankten Patienten bezogen auf die untersuchte Grundgesamtheit aufgeführt (Weiß 2013). Der Vergleich der beiden Testsysteme erfolgte anhand von 80 Stuhlproben.

Mit dem Triage-Test wurden insgesamt fünf Stuhlproben von Patienten falsch-negativ getestet, die in der vorherigen mikroskopischen Untersuchung eindeutig als *Giardia lamblia* positiv oder *Cryptosporidium parvum*

positiv befundet worden waren. Der RIDA Quick-Test gab hingegen bei diesen Proben die korrekte Bandenbildung (richtig-positives Ergebnis) zu erkennen.

Entsprechend der errechneten Werte der positiven Vorhersagewerte ist ein positives Testergebnis als unzweifelhafte Bestätigung für eine Erkrankung bzw. einen Befall mit Protozoen zu bewerten. Hingegen zeigt der negative Vorhersagewert des Triage-Tests einen Wert von 0,9020, der dementsprechend die Zuverlässigkeit des Testergebnisses herabsetzt.

### Abschließende Bewertung der möglichen Indikation der Tripletests

Die mikroskopisch-parasitologische Stuhl-diagnostik erfasst alle intestinale Protozoen und Helminthen und ist im Rahmen der med. parasitologischen Untersuchung nicht ersetzbar. Voraussetzung für diese Methode ist jedoch eine entsprechende Laborausstattung, ein erfahrener Experte, der Anreicherungstechniken und Färbetechniken beherrscht, sowie eine sehr versierte lichtmikroskopisch-morphologische Diagnostik durchführen kann. Zur raschen Aufdeckung

epidemiologisch relevanter Vorgänge, zum Screening bei Ausbruchssituationen sowie zur Erfassung von akuten Krankheitsverläufe auslösenden parasitären Krankheitserregern ist ein Schnelltest jedoch hilfreich, vor allem wenn gleich drei relevante Antigene simultan detektiert werden. Zur Unterstützung der Routinediagnostik kann er ergänzend zur mikroskopischen Diagnostik eingesetzt werden. Schnelltestsysteme können in den mikrobiologischen Einsatzlaboren leicht implementiert werden. Im Vergleich zu anderen Nachweismethoden wie Mikroskopie oder PCR benötigen sie weder eine besonders aufwändige Ausstattung, noch einen ausgewiesenen Experten. Zur Arbeitsentlastung in beengten Arbeitsverhältnissen und zur zeitlichen Entlastung der Kapazitäten des Feldlabors vor Ort kann ein Schnelltest maßgeblich beitragen. Bei Screening-Maßnahmen bezüglich Flüchtlingsproblematiken etc. (im Rahmen der humanitären Hilfe) kann der Test ebenfalls hilfreich und damit eine Erleichterung sein.

Beide Schnelltests bringen im Vergleich zu Duo- oder Mono-Testsystemen bei etwa gleichem Zeitaufwand drei Ergebnisse. Die ebenfalls kommerziell erhältlichen Duo-Testsysteme weisen hingegen nur zwei Antigene, die Teststreifenmethode oder Kassettenmethode in den Einzeltests nur ein parasitäres Erregerantigen nach. Der Sensitivität und Spezifität anderer kommerziell erhältlichen ELISA sind die Schnelltests gemäß den Angaben zur Sensitivität und Spezifität vergleichbar. Somit sind die Tripletests als eine echte Alternative zu den aufwändigen und zeitintensiven Einzel-ELISA zu betrachten, zumindest wenn diese nicht automatisiert ablaufen.

Die hier verglichenen Schnelltestsysteme sind beide kommerziell erhältlich. Unterschiede zwischen den beiden getesteten Schnelltestsystemen bestehen besonders im Umfang der benötigten Hilfsmittel und des Zeitaufwandes zur Durchführung der Untersuchung. Der Triage-Test ist zwar in seiner Anwendung etabliert, weist aber im direkten Vergleich Schwächen hinsichtlich der Sensitivität für die Protozoen *Giardia lamblia* und *Cryptosporidium parvum* auf. Dies schlägt sich auch im Ergebnis der negativen Vorhersagewerte nieder (Triage: 0,9 gegenüber RIDA Quick: 1), die eine Aussage über die Güte des Ergebnisses bei einem negativen Befund bewerten. Hinsichtlich der Kosten und des zeitlichen Aufwandes zur Durchführung des Tests ist der RIDA Quick-Test die effizientere Variante. Beide Aspekte lassen sich auch auf eine zu erwartende Verringerung der Personalkosten übertragen.

Keiner der Tests ist in der Lage, mehr als die drei festgelegten Protozoen zu erkennen. Demzufolge ergeben sich negative Ergeb-

### Ein Vergleich der Vorhersagewerte verdeutlicht anhand des Bayes-Theorems die bedingten Wahrscheinlichkeiten

- a) für das Vorliegen eines Protozoen-Befalls nach Erhalt eines positiven Testergebnisses [positive Vorhersagewerte – positive predictive value – ppv].
- b) trotz eines negativen Testergebnisses von einem der aufgeführten Protozoen befallen zu sein [negative Vorhersagewerte – negative predictive value – npv]

Je näher der berechnete Wert an 1 heranreicht, desto unzweifelhafter ist das Testergebnis. Unter Berücksichtigung der Prävalenz bezogen auf die definierte Grundgesamtheit ergaben sich die nachfolgenden Vorhersagewerte:

- a) RIDA Quick:

$$P(K|T_+) = \frac{P(K) * P(T_+|K)}{P(K) * P(T_+|K) + P(\bar{K}) * P(T_+|\bar{K})} = 1$$

Triage:

$$P(K|T_+) = \frac{P(K) * P(T_+|K)}{P(K) * P(T_+|K) + P(\bar{K}) * P(T_+|\bar{K})} = 1$$

- b) RIDA Quick:

$$P(\bar{K}|T_-) = \frac{P(\bar{K}) * P(T_-|\bar{K})}{P(\bar{K}) * P(T_-|\bar{K}) + P(K) * P(T_-|K)} = 1$$

Triage:

$$P(\bar{K}|T_-) = \frac{P(\bar{K}) * P(T_-|\bar{K})}{P(\bar{K}) * P(T_-|\bar{K}) + P(K) * P(T_-|K)} = 0,9020$$

[ $P(K)$  = Prävalenz;  $P(\bar{K}) = 1 - \text{Prävalenz}$ ;  $P(T_-|\bar{K})$  = Spezifität;  $P(T_-|K) = 1 - \text{Sensitivität}$ ]

nisse für: *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *Blastocystis* sp. und *Chilomastix mesnili*. Zum Nachweis bzw. zur Differenzierung dieser Organismen ist stets eine mikroskopische Untersuchung, die Anwendung der Teleparasitologie oder eine Übersendung der Proben ins Leitlabor vorgesehen.

Eine Differenzierung pathogener *Entamoeba histolytica* und apathogener *Entamoeba dispar* Infektionen ist mikroskopisch-morphologisch kaum möglich (Ackers 2002; Scheid 2011). Auch die beiden vorliegenden Schnelltests unterscheiden nicht zwischen *E. histolytica* und *E. dispar*. Die (Nativ-) Stuhlprobe sollte aus den mikrobiologischen Einsatzlaboratorien entsprechend bei bestehendem Verdacht und positivem Screening-Ergebnis in das Referenzlabor im Heimatland (Leitlabor in Koblenz) zur weiteren med. parasitologischen Diagnostik (spez. ELISA oder PCR zur Differenzierung) geschickt werden.

Die Untersuchung von fixiertem Stuhl ist ebenfalls bei beiden Systemen nicht möglich. Lediglich frischer (nativer) Stuhl oder eingefrorene Stuhlproben können untersucht werden. Der Einsatz im Labor für Medizinische Parasitologie über einige Jahre zeigte bezüglich positiver *Giardia lamblia*-Proben, dass eine Probenlaufzeit (Nativprobe) von bis zu sechs Tagen keine negativen Auswirkungen auf das Testergebnis des Triage-Tests hatte (Mikroskopische Untersuchungsergebnisse als Referenz).

Betrachtet man die Vorteile eines Schnelltests im Feldlabor sind Handhabbarkeit, schnelle Durchführbarkeit und natürlich auch die Kosteneffizienz als wichtigste Eigenschaften zu nennen. Entsprechend des vorliegenden Vergleiches der Testsysteme Triage® Micro Parasite Panel der Firma BIOSITE Diagnostics und des alternativen Tests RIDA® Quick Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi der Firma R-Biopharm ist auch die Sensitivität der Systeme ein hervorstechendes Unterscheidungsmerkmal.

Im direkten Vergleich der Systeme, auch unter Einbeziehung bzw. dem Vergleich der möglichen Fehlerquellen gemäß eigener SOP im Qualitätsmanagementhandbuch ist ein Vorteil bezüglich der hier angewandten Bewertungskriterien für den RIDA Quick-Test zu erkennen. Grundsätzlich eignen sich beide Testsysteme für den Einsatz in den mikrobiologischen Einsatzlaboratorien der Bundeswehr und stellen eine sehr gute Ergänzung zur mikroskopischen parasitologischen Diagnostik dar. Eine abschließende Bewertung kann (und sollte auch) erst nach einem ausreichend langen (täglichen Routine-) Einsatz im mikrobiologischen Einsatzlabor und der erneuten Aufarbeitung der dargestellten Bewertungsparameter erfolgen.

## Ausblick

Molekularbiologische Techniken, um diese drei relevanten parasitären Erreger zu detektieren, sind bereits als Einzel-PCR oder als Multiplex-PCR etabliert. Die Sensitivität und Spezifität wird im nächsten Schritt auch gegen diese Methoden als Referenz zu vergleichen sein, auch wenn diese zeitaufwändiger sind und einer nicht unerheblichen Ausstattung bedürfen. Interessant wird auch sein, inwieweit die „Feldtauglichkeit“ für den Einsatz in den mikrobiologischen Einsatzlaboratorien umsetzbar ist.

## Acknowledgements

Für Ihre Unterstützung im Rahmen der Evaluation danken wir Frau Katja Frieden und Frau Linda Jungmann (beide MTLA im Zlnst-SanBw Koblenz). Weiterhin danken wir Prof. Dr. Dausgries, Institut für Parasitologie, Universität Leipzig für die Bereitstellung der Kryptosporidien. Dank auch an Dr. Thomas Weber, DLR, für seine Unterstützung. ■

## Literatur

1. Ackers, J.: The diagnostic implications of the separation of *E. histolytica* and *E. dispar*; *J Biosc*; 27; 573-578; 2002
2. Eckert, J; Jacquier, P; Weber R: Intestinale Protozoen – neue Aspekte; *Internist*; 31; 386-398; 1990
3. Garcia, L.S; Shimizu, R.Y; Bernard, C.N: Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* Antigens in Human Fecal Specimens Using the Triage Parasite Panel Enzyme Immunoassay; *J Clin Microbiol*; 3337-3340; 2000
4. Goni, P; Martin, B.; Villacampa, M.; Garcia, A.; Seral, C.; Castillo, F.; Clavel, A.: Evaluation of an immunochromatographic dip stick test for simultaneous detection of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba histolytica* antigens in human faecal samples; *Eur J Clin Microbiol Dis*; 2077-2082; 2012
5. Hess, A.S.; Shardell, M.; Johnson, J.K.; Thom, K.A.; Strassle, P.; Netzer, G.; Harris, A.D.: Methods and recommendations for evaluating and reporting an new diagnostic test; *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 31(9): 2111–2116; 2012
6. Mehlhorn, H.: Die Parasiten des Menschen. Erkrankungen erkennen, bekämpfen und vorbeugen; Springer Verlag Berlin, Heidelberg; 7. Aufl.; 2012
7. Nothdurft, H.D.; Sonnenburg, F.v; Löscher, Th: Importierte Infektionen bei Tropenreisenden; *Mitt Österr Ges Tropenmed Parasitol* 14; 223-230; 1992
8. Okhuysen, P.C.: Traveler's Diarrhea Due to Intestinal Protozoa; *Travel Medicine*; CID; 33; 10-114; 2011
9. Scheid, P.: Intestinale Parasitosen, ein Gefahrenpotential bei Auslandseinsätzen; *Wehrmedizinische Monatsschrift*; 1/48; 2004
10. Scheid, P.: Entamöbiasis; *Handbuch der Infektionskrankheiten*; ecomed-Verlag; 2011
11. Scheid, P.: Kryptosporidiose; *Handbuch der Infektionskrankheiten*; ecomed-Verlag; 2013a

12. Scheid, P.: Use of Telemedicine for the diagnosis of parasites and viruses in a deployed setting; *Medical Cops International Forum (MCIF)*; 3; 29-31; 2013b
13. Scheid, P.; Over, B.: Parasitologische Stuhl Diagnostik: Evaluierung eines neuen Färbesystems; *MTA Dialog*; 10; 764-770; 2007
14. Scheid, P.; Thoma, B.; Kayßer, P.; Zöller, L.: Intestinal parasites in afghan residents employed in camp warehouse, Kabul; *Infection*; 33; 2005
15. Stark, D.; Barrat, J.; van Hal, S.; Marriot, D.; Harkness, J.; Ellis, J.: Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population; *Clin Microbiol Rev*; 22; 634-649; 2009
16. Weinke, T., Güthoff, W, Liesenfeld, O: Reisediarrhoe; *Dtsch Med Wschr*; 123; 533-536; 1998
17. Weiß, C.: Basiswissen Medizinische Statistik; 6. Aufl.; Springerverlag; 2013
18. Weitzel, T.; Dittrich, S.; Möhl, I.; Adusu, E.; Jelinek, T.: Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples; *Clin Microbiol Infect*; 12; 656-659; 2006

## Die Autoren:

Ferse, M.<sup>1</sup>; Njil, S. <sup>1</sup>; Bartholomé, E. <sup>2</sup>; Scheid, P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr; Labor für Med. Parasitologie; Laborabteilung Medizin; Andernacherstr. 100; 56070 Koblenz  
<sup>2</sup> Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V. (DLR); Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin; Biomedizinisches Wissenschafts-Unterstützungszentrum; Linder Höhe; 51147 Köln

