

RIDA[®]QUICK
Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi

Art. n°.: N1722



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17. D-64297 Darmstadt, Alemania
Teléfono: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Área de aplicación

Para el diagnóstico *in vitro*. El test rápido RIDA®QUICK Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi es un ensayo inmunocromatográfico para la identificación cualitativa de *Cryptosporidium parvum* y/o *Giardia lamblia* y/o *Entamoeba histolytica* (sensu lato) en muestras de heces.

2. Resumen y explicación del test

La **Giardia lamblia** pertenece a los flagelados intestinales. Los trofozoitos característicos morfológicamente sobreviven sólo un corto tiempo fuera del organismo hospedador. Los quistes son altamente infecciosos y sirven para su transmisión. Debido a su amplia propagación en el mundo la *Giardia lamblia* constituye una de las causas importantes de las enfermedades diarreicas crónicas, especialmente al enfocar la problemática de la medicina para viajeros. La infección se manifiesta después de la ingestión de quistes contenidos en alimentos y agua contaminada. En instituciones colectivas con higiene deficiente, la infección se transmite generalmente de persona a persona por vía fecal-oral. Esta vía de transmisión es frecuente en guarderías, jardines infantiles y asilos, así como en homosexuales varones. Los padres pueden a su vez ser infectados por sus hijos. En contraste con los niños pequeños, en el caso de niños mayores infectados los síntomas pueden estar ausentes. No obstante ellos excretan quistes y pueden infectar a otras personas. La giardiasis (lambliasis) se manifiesta como diarrea aguda o crónica. El tiempo de incubación está entre 3 y 42 días. El método más frecuente para el diagnóstico de la giardiasis en el pasado era la identificación microscópica de quistes en las heces, para lo cual debe existir personal experimentado disponible. Los exámenes requieren realizarse durante un período de tiempo largo, ya que la excreción de quistes se caracteriza por tener grandes fluctuaciones.

El **Cryptosporidium parvum** es un parásito ampliamente extendido en animales y que también aparece en animales domésticos como agente patógeno importante, especialmente en los terneros. Hoy en día se observan, más frecuentemente de lo que se suponía antes, infecciones también en humanos en muchos países. El parásito causa a menudo diarreas endémicas y epidémicas en niños de países tropicales en desarrollo. En pacientes inmunocompetentes la enfermedad se manifiesta como una gastroenteritis de curación espontánea. La diarrea dura entre 3 y 10 días y puede estar acompañada de fiebre y síntomas gastrointestinales tales como náuseas y dolor similares a los que produce la giardiasis (lambliasis). Mucho más graves son los síntomas y efectos en pacientes inmunodeficientes en los cuales las diarreas tienen un curso peor y son persistentes. La transmisión de la infección se puede efectuar del animal al hombre a través del agua contaminada, sin embargo también puede ocurrir de persona a persona. Los miembros de instituciones colectivas como los niños en jardines infantiles así como los grupos de riesgo de hombres homosexuales y los infectados con SIDA están especialmente en peligro. El método aplicado con más frecuencia en el pasado

para el diagnóstico de criptosporidiosis era la identificación microscópica de oocistos en heces o el examen microscópico de muestras de biopsias del intestino delgado, para las cuales era necesario tener disponible personal experimentado.

La **Entamoeba histolytica (sensu lato)** puede llegar a infectar cada año hasta 500 millones de personas en el mundo. Las investigaciones en el campo de la genética molecular han demostrado que los protozoos denominados *Entamoeba histolytica* que han sido identificados con los métodos convencionales de diagnóstico, consisten en dos especies no diferenciables morfológicamente, la especie patógena *Entamoeba histolytica sensu stricto* y la especie que hasta hoy se considera no patógena, la *Entamoeba dispar*. Se estima que el 90 % de las infecciones con *Entamoeba* son producidas por la especie *E. dispar*. Los 40 - 50 millones de casos anuales de colitis amebiana y absceso hepático con sus 80.000 muertes provocadas tienen su origen en la *E. histolytica*.

El ciclo vital de la *Entamoeba* es relativamente sencillo. La infección se lleva a cabo mediante la ingestión oral de quistes de cuatro núcleos. A partir de ellos se desarrolla en el intestino delgado la forma vegetativa uninuclear del parásito, el trofozoito (forma minuta), el cual efectúa su multiplicación y diferenciación predominantemente en el colon. Se supone que la enquistación se desencadena a causa del medio existente en la región inferior del colon. Los trofozoitos solamente coexisten junto a quistes cuando las heces pasan de forma acelerada por el intestino.

Los síntomas clínicos de una amebiasis se desencadenan al pasar la invasión del parásito de la luz intestinal a las mucosas del colon. Aquí se encuentran con frecuencia trofozoitos con eritrocitos fagocitados. Estos trofozoitos se denominan forma magna por su tamaño. Las consecuencias de la invasión de la mucosa intestinal son diarrea, disentería o incluso formación de amebomas. Como complicación de la diseminación pueden surgir abscesos hepáticos, abscesos pulmonares o también, aunque más raramente, incluso abscesos cerebrales, los cuales si no se tratan a tiempo pueden provocar la muerte.

Los síntomas clínicos de la forma intestinal aguda de la amebiasis son calambres abdominales con náuseas y diarreas intensas y mucosanguinolentas. El estado agudo puede convertirse en estado crónico con diarreas ocasionales alternando con constipación, dolores abdominales, náuseas y vómitos. Se han descrito también casos de sujetos totalmente asintomáticos excretores de quistes.

Alrededor del 10% de los casos con una disentería amebiana aguda llega a padecer de complicaciones extraintestinales como abscesos hepáticos o infección a otros órganos. En los casos de amebiasis extraintestinal está indicado un análisis serológico de anticuerpos.

El diagnóstico de la amebiasis intestinal se puede realizar con ayuda de técnicas microscópicas costosas para la identificación de los quistes y los trofozoitos en las heces. Debido a que la densidad de parásitos puede ser muy baja, se asume que la sensibilidad de este método en una investigación individual de las heces, aun con personal experimentado, generalmente no pasa del 75 % de efectividad. En adición a esto existe también el riesgo de la confusión de *Entamoeba* con células del epitelio intestinal, con granulocitos, macrófagos u hongos.

Una gran ventaja brindan en este caso los procedimientos inmunológicos analíticos de gran sensibilidad con anticuerpos específicos contra antígenos de Entamoeba. De esta forma es posible un diagnóstico sin depender de valoraciones subjetivas y con una mayor sensibilidad, ya que es posible abarcar en el análisis a componentes morfológicamente no identificables de otro modo. Solamente la forma invasiva de Entamoeba provoca la formación de anticuerpos. Debido a que el título de anticuerpos en la mayoría de los casos ya es detectable al comienzo de la sintomatología clínica, es posible servirse de un estudio de anticuerpos específicos para la identificación de E. histolytica. Un procedimiento de este tipo brinda además la posibilidad de diferenciar, según el nivel de anticuerpos, entre una amebiasis intestinal y una extraintestinal, lo que es decisivo para la elección de la terapia a seguir.

Un método importante alternativo a la microscopía, para la identificación tanto de Giardia lamblia como de Cryptosporidium parvum, es el ensayo rápido inmunocromatográfico que se describe a continuación, cuya sensibilidad y especificidad mediante el uso de anticuerpos monoclonales le confieren la misma eficacia que poseen los exámenes microscópicos. La realización es sencilla y rápida sin necesidad de personal con calificación microbiológica especializada.

3. Fundamento del test

El presente test rápido es un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral de un solo paso, en el cual los anticuerpos específicos contra el antígeno de cada parásito están absorbidos en partículas verdes de látex (específico para Entamoeba), en partículas rojas de látex (específico para Giardia) o en partículas azules de látex (específico para Cryptosporidium). Otros anticuerpos específicos contra estos tres agentes patógenos están unidos fuertemente sobre la membrana. Primeramente se suspende la muestra de heces en el buffer de extracción y se deja sedimentar. La tira reactiva se sumerge en el sobrenadante de la muestra, se adhiere a las partículas coloreadas de látex y en caso positivo se enlaza al antígeno presente en la muestra; atraviesa la membrana y se acopla a la banda específica de captura. Según el antígeno presente en la muestra se observará una banda verde y/o una banda roja y/o una banda azul.

4. Contenido del envase

Los reactivos de un envase alcanzan para 25 determinaciones

Strip	25 determ.	Tubito con 25 tiras reactivas de prueba
Diluent	26 ml	Buffer de extracción, listo para el uso; contiene azida de sodio al 0,1 %

5. Reactivos y su almacenamiento

El envase se puede conservar entre 2 – 30 °C y se puede usar hasta la fecha de vencimiento impresa en la etiqueta. Después de la fecha de vencimiento no se asumen garantías de calidad. El tubito con la tira reactiva de prueba contiene un agente desecante y no debe dejarse abierto para evitar la entrada de humedad. Se debe por tanto cerrar cuidadosamente después de sacar cada una de las tiras reactivas.

6. Reactivos adicionales necesarios – accesorios requeridos

- Tubitos de muestras para las suspensiones de heces
- Tubitos (opcional: pocillos de microplaca sin recubrir) para suspensión sobrenadante
- Agitador Vortex (opcional)
- Micropipetas (200 µl -1000 µl)
- Recipiente de desechos con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%

7. Medidas de seguridad

Sólo para el diagnóstico *in vitro*.

Este test debe ser realizado solamente por personal calificado de laboratorio. Se deben observar las líneas directivas de trabajo para laboratorios médicos. Las instrucciones para el uso del test deben cumplirse estrictamente.

El buffer de dilución de muestras contiene azida de sodio como agente conservante. Se debe evitar, por tanto, el contacto con la piel o mucosas.

No se debe pipetear las muestras o reactivos con la boca, así como también evitar el contacto con piel lesionada o mucosas. Durante el trabajo con las muestras deben usarse guantes desechables y lavar las manos después del test. En los locales donde se trabaje con las muestras no está permitido fumar, comer o beber.

Es necesario que todos los materiales y reactivos que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas se sometan a un tratamiento con agentes desinfectantes adecuados (por ej. hipoclorito de sodio) o se esterilicen en autoclave por lo menos durante una hora a 121 °C.

8. Recolección y conservación de las muestras

Las muestras de heces se deben coleccionar en recipientes limpios sin ningún tipo de aditivo y conservar entre 2 – 8 °C antes del comienzo del test. Si se guarda por más 3 días, la muestra se debe congelar a -20 °C. En este caso la muestra se descongela completamente antes del inicio del test y se lleva a temperatura ambiente. Evite congelar y descongelar las muestras varias veces.

Si se van a utilizar frotis rectales se debe prestar atención a que haya suficiente material de heces (aprox. 50 mg) para la realización del test.

9. Realización del test

9.1. Generalidades

Las muestras, el buffer de extracción y las tiras reactivas deben ajustarse a temperatura ambiente (20 – 25 °C) antes de proceder a utilizarlas. El frasco con las tiras reactivas sólo se debe abrir después de alcanzar la temperatura ambiente y cerrar nuevamente después de extraer las tiras que se necesiten. Las tiras que se hayan usado una vez no se pueden volver a utilizar. Se debe evitar la incidencia directa de la luz solar durante la realización del test.

Las cantidades sobrantes de reactivo no se deben retornar a los frascos, ya que esto puede provocar una contaminación.

9.2. Preparación de las muestras

En un tubo de ensayo rotulado se vierte 1 ml de buffer de extracción **Diluent**. En el caso de una muestra **líquida** de heces se aspiran con una pipeta desechable **Pipet** 100 µl (tomando hasta un poco por encima del segundo espesamiento) y se hace una suspensión en el tubo de ensayo con el buffer. En caso de muestras **sólidas** de heces se suspenden 50 mg en el buffer. Acto seguido se debe homogeneizar bien la muestra. Esto se efectúa mediante la aspiración y expulsión repetida de la suspensión con la pipeta desechable **Pipet** o alternativamente por agitación en un mezclador Vortex. Después se deja sedimentar la suspensión homogénea al menos **3 minutos** hasta que se forme un sobrenadante claro, del cual se transfieren por lo menos **200 µl**, hasta un máximo de **500 µl**, a otro tubo de ensayo limpio (o a un pocillo no recubierto de la microplaca).

9.3. Análisis de las muestras

La tira reactiva de prueba **Strip** se extrae del frasco y se sumerge en la muestra preparada. La tira reactiva sólo debe introducirse hasta un punto en que la línea marcada con las flechas no se sobrepase. Después de **10 minutos** se puede leer el resultado.

10. Control de calidad – Indicios de reactivos vencidos

El test sólo debe evaluarse si la tira reactiva está intacta **antes** de sumergirla en la suspensión preparada de la muestra y no se ven en ella cambios de coloración o bandas. Además es imprescindible que se vea, **después** de la incubación, por lo menos la banda **rojo púrpura** de control. Si ésta no aparece, se deben hacer las siguientes comprobaciones antes de repetir el test:

- Durabilidad de las tiras reactivas y del buffer de extracción utilizado
- Ejecución correcta del test
- Contaminación del buffer de extracción

Si entonces, en la repetición del test con una nueva tira reactiva, tampoco es visible la banda de control, usted se debe dirigir al fabricante o a su distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

Como máximo, deben aparecer cuatro bandas, vistas desde el punto de absorción de la muestra y en el siguiente orden: Una banda **azul**, una **roja**, una **verde** y una banda **rojo púrpura** (de control). **¡Si no aparece la banda rojo púrpura de control el test no es evaluable y por tanto inválido!**

Las siguientes interpretaciones son posibles:

- **Cryptosporidium positivo:** banda **azul** y banda **rojo púrpura** son visibles.
- **Giardia positivo:** banda **roja** y banda **rojo púrpura** son visibles.
- **Entamoeba positivo:** banda **verde** y banda **rojo púrpura** son visibles
- Además, pueden presentarse también todas las posibles combinaciones de las tres bandas específicas de la muestra con la banda rojo púrpura de control, en dependencia de si están presentes los tres agentes patógenos en la muestra.
- **Negativo:** Sólo aparece **la banda rojo púrpura** de control.
- **Inválido:** No hay bandas visibles o existe otra situación diferente a la descrita más arriba, así como otras coloraciones de las bandas. Igualmente, si hay coloraciones de bandas que aparecen después de 10 minutos o más tarde, éstas se deben evaluar como carentes de valor diagnóstico.

12. Limitaciones del método

El ensayo RIDA[®]QUICK Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi identifica el antígeno de Cryptosporidium parvum y/o Giardia lamblia y/o Entamoeba histolytica (sensu lato) en muestras de heces. No es posible establecer una relación entre la intensidad de la banda específica visible y la manifestación o gravedad de síntomas clínicos. **Los resultados obtenidos siempre deben interpretarse de conjunto con el cuadro clínico.**

Un resultado **positivo** no excluye la presencia de otros agentes infecciosos.

Un resultado **negativo** no excluye una posible infección con *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* o *Entamoeba*. La causa de ello puede ser una excreción intermitente del agente patógeno o una cantidad demasiado baja de antígeno en la muestra. Si existe la sospecha anamnésica fundada de una infección con los agentes patógenos analizados se debe repetir el análisis a otra muestra de heces del paciente.

Un exceso de muestra de heces puede provocar bandas de color pardusco en lugar de las bandas con colores específicos. Estas bandas de color pardusco no tienen valor diagnóstico. En tales casos se debe realizar un nuevo análisis con una cantidad de heces menor o con una dilución más de la suspensión ya preparada (sobrenadante claro después de la sedimentación), para esclarecer si los agentes patógenos buscados están realmente presentes en la muestra y fueron enmascarados por usar demasiada matriz de heces.

13. Características de rendimiento

13.1. Estudio clínico comparativo

En un estudio multicéntrico con la participación de 5 instituciones diferentes se analizaron con el ensayo rápido RIDA[®]QUICK *Cryptosporidium*/*Giardia*/*Entamoeba* Combi un total de 252 muestras de heces, las cuales ya se habían examinado con distintos métodos y posteriormente congelado para su conservación. Los resultados individuales se resumen en la tabla 1 y se presenta la sensibilidad y especificidad media calculada a partir de los estos resultados en los 5 centros de validación.

Tab.1 Comparación de los resultados del estudio multicéntrico con el ensayo rápido RIDA[®]QUICK *Cryptosporidium*/*Giardia* Combi

Método de referencia	Muestras				Banda específica del parásito					
	total	pos.	negativo		<i>Cryptosporidium</i>		<i>Giardia</i>		<i>Entamoeba</i>	
			Ningún otro parásito		Sens.	Espec.	Sens.	Espec.	Sens.	Espec.
Microscopía	28	28	0	0	87,5	-	80	-	60	-
Microscopía	63	32	20	11	100	100	100	100	-	100
Microscopía	32	12	15	5	-	-	88,9	100	100	80
Microscopía/ PCR	49	35	5	9	66,7	79,9	94,4	100	79,2	76
Elisa	80	63	17	0	77,8	100	96,3	98,1	100	93,6
Suma	252	170	57	25	83,0 %	93,3%	91,9%	99,5%	84,8%	87,4%

13.2. Reactividad cruzada

Ninguno de los siguientes parásitos intestinales condujo a una reacción cruzada en el ensayo RIDA®QUICK Cryptosporidium/Giardia/ Entamoeba Combi:

Entamoeba coli

Blastocystis hominis

Chilomastix mesnili

Endolimax nana

Entamoeba nana

Entamoeba hartmannii

Hymenolepsis nana

Isospora belli

Isospora felis

Iodamoeba butschlii

Bibliografia

1. Black, R. E. et al.: Giardiasis in day-care centers: Evidence of person-to-person transmission. *Pediatrics* 60 (No. 4), 486 - 491 (1977).
2. Craun, G. F.: Waterborne Giardiasis in the United States: A review. *Am. J. Pub. Health* 69 (No. 8), 817 - 819 (1979).
3. Nask, T. E. et al.: Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis.* 156 (No. 6), 974 - 984 (1987).
4. Smith, H. V. et al.: *Giardia* and Giardiasis: What's in a name? *Microbiol. Eur.* 3 (No. 1), 22 - 29 (1995).
5. Thompson, R. C. A., Reynoldson, J. A.: *Giardia* and Giardiasis. *Adv. Parasitol.* 32, 71 - 160 (1993)
6. Xiao, L.: *Giardia* infection in farm animals. *Parasitology today* 10 (No. 11), 436 - 438 (1994).
7. Schunk, M. et al.: Detection of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* in stool samples by two enzyme immunoassays. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20, 389 - 391 (2001)
8. Clavel, A.: Evaluation of the optimal number of fecal specimens in the diagnosis of cryptosporidiosis in AIDS and immunocompetent patients. *Eur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14, 46-49 (1995).
9. Current, W. L., Garcia, L. S.: Cryptosporidiosis. *Clinics in Laboratory Medicine* 11 (No. 4), 873 - 895 (1991).
10. Current, W. L., Garcia, L. S.: Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4 (No. 3), 325 - 358 (1991).
11. Flanigan, T. P.: Human immunodeficiency virus infection and cryptosporidiosis: Protective immune responses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50 (5) Suppl., 29 - 35 (1994).
12. Guarino, A. et al.: Human intestinal cryptosporidiosis: secretory diarrhea and enterotoxic activity in Caco-2 cells. *J. Infect. Dis.* 171, 976 - 983 (1995).
13. Hayes, E. B. et al.: Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. *New. Engl. J. Med.* 320 (No. 21), 1372 - 1376 (1989).
14. Le Chevallier, M. W. et al.: *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in filtered drinking water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (No. 9), 2617 - 2621 (1991).
15. Mc. Anulty, J. M. et al.: A community wide outbreak of cryptosporidiosis associated with swimming at a wave pool. *Jama* 272 (No. 20), 1597 - 1600 (1994).
16. Bracha, R. et al.: Differentiation of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* by using specific DNA probes. *Clin. Microbiol.* 28 (No. 4), 680 - 684 (1990).
17. Citronberg, R. J., Semel, J. D.: Severe vaginal infection with *Entamoeba histolytica* in a woman who recently returned from Mexico: Case report and review. *Clin. Infect. Dis.* 20, 700 - 702 (1995).
18. Espinosa-Cantellano, M., Martinez-Palomo, A.: *Entamoeba histolytica*: Mechanism of surface receptor capping. *Exp. Parasitol.* 79, 424 - 435 (1994).

19. Katzwinkel-Wladarsch, S. et al.: Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimen. *Am. J. Trop. Med.-Hyg.* 51 (1), 115 - 118 (1994).
20. Kean, B. H. et al.: Epidemic of amoebiasis and giardiasis in a biased population. *Brit. J. Ven. Dis.* 55, 375 - 378 (1979).
21. Mannweiler, E.: Immundiagnostik der Amöbiasis. *Der Mikrobiologe* 5. Jg., Heft 6, 194 - 200 (1995).
22. Ohnishi, K. et al.: Brain abscess due to infection with *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51 (2), 180 - 182 (1994).
23. Petter, R. et al.: Characterization of two distinct gene transcripts for ribosomal protein L 21 from pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica*. *Gene* 150, 181 - 186 (1994).
24. Reed, Sh. L.: New Concepts regarding the pathogenesis of amebiasis. *Clin. Infect. Dis.* 21 (Suppl. 2), 182 - 185 (1995).
25. Strachan, W. D. et al.: Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Lancet* 12, 561 - 563 (1988).
26. van Lunzen, J., Tannich, E., Burchard, G.-D.: Amöbenruhr und Amöbenleberabszeß. *Deutsches Ärzteblatt* 93, Heft 2, 2659 - 2665 (1996).