

VITASSAY

Crypto+Giardia+ Entamoeba

Test rápido de detección cualitativa simultánea de cryptosporidium, giardia, y entamoeba (histolytica o dispar) en muestras de heces humanas

IU-7715037 Ed01 Abril 2017



Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*..

USO PREVISTO

Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba es un test rápido, inmunocromatográfico, de un solo paso para la detección cualitativa simultánea de *Cryptosporidium*, *Giardia* y *Entamoeba* (histolytica y dispar) en muestras de heces humanas.

Ensayo sencillo, no invasivo y de alta sensibilidad para realizar un diagnóstico presuntivo de infección causada por *Cryptosporidium*, *Giardia* y/o *Entamoeba*.

INTRODUCCIÓN

Aunque puede haber otras posibles causas de diarrea, los protozoos entéricos *E. histolytica*, *G. Lamblia* and *Cryptosporidium spp.* han sido reconocidos como causas importantes de diarrea entre seres humanos. *E. histolytica* es un parásito patógeno para el cual el humano es el reservorio primario. La presentación clínica puede variar desde portadores asintomáticos a enfermedades gastrointestinales e invasivas. *E. histolytica* es morfológicamente idéntica a las especies no patogénicas de *E. dispar* y *E. moshkovskii*, aunque se han confirmado diferencias genéticas que las separa en especies independientes.

G. lamblia (sinónimo de *G. intestinalis* y *G. duodenalis*) es la infección por protozoos más común del tracto intestinal en el mundo. Algunos países, especialmente en países en desarrollo, muestran una tasa alta de infección de giardiasis. Se cree que la giardiasis sigue siendo un problema importante de salud. La mayoría de las personas infectadas son niños que sufren y experimentan retardo en el crecimiento. La cryptosporidiosis es una causa frecuente de enfermedad diarreica en humanos. La infección se adquiere vía feco-oral, y *C. parvum* ha sido reconocido como la causa de brotes de gastroenteritis producidos por contaminación del agua y contaminación de los alimentos. Los pacientes presentan diarrea autolimitante que puede durar de varias semanas a meses.

La transmisión de parásitos intestinales depende de la presencia de individuos infectados, de la poca higiene y principalmente de factores socio económicos y de comportamiento de la población.

Además, la giardiasis, la cryptosporidiosis y la amebiasis puede dar lugar a diarrea severa, problemas en la función intestinal y malnutrición, condiciones que están frecuentemente asociadas a la pobre función cognitiva y fallo en el retraso del crecimiento en la temprana infancia.

Estos tres parásitos pueden causar brotes por contaminación del agua, y también han sido descritos brotes por contaminación en los alimentos.

PRINCIPIO

Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba es una prueba cualitativa inmunocromatográfica para la detección de *Cryptosporidium*, *Giardia* y *Entamoeba (histolytica y dispar)* en muestras de heces humanas

Tira A: En la zona de la línea del test de la membrana se han fijado unos anticuerpos monoclonales frente a *Crypto*.

Tira B: En la zona de la línea del test de la membrana se han fijado unos anticuerpos monoclonales frente *Giardia*.

Tira C: En la zona de la línea del test de la membrana se han fijado unos anticuerpos monoclonales frente a *Entamoeba (histolytica y dispar)*.

Durante el proceso, la muestra reacciona con los anticuerpos frente a *Crypto* (tira A) y/o *Giardia* (tira B), y/o *Entamoeba* (tira C) formando conjugados. La mezcla se mueve hacia la parte de arriba de la membrana por acción capilar. Si la muestra es *Crypto* positiva, los anticuerpos presentes en la membrana (línea de test) reaccionarán con la mezcla de conjugado y aparecerán una línea coloreada **roja** en la tira A. Si la muestra es *Giardia* positivo, los anticuerpos presentes en la membrana (línea de test) reaccionarán con la mezcla de conjugado y aparecerán una línea coloreada **roja** en la tira B. Si la muestra es *Entamoeba* positivo, los anticuerpos presentes en la membrana (línea de test) reaccionarán con la mezcla de conjugado y aparecerán una línea coloreada **roja** en la tira C. Aunque la muestra sea positiva o negativa, la mezcla continua moviéndose a través de la membrana y la línea **verde** de control siempre aparecerá (para todas las tiras).

La presencia de estas líneas **verdes** (en la zona de control (C)) en las tres tiras indica que el volumen añadido es suficiente, que el flujo ha sido el adecuado y también sirve como control interno de los reactivos.

PRECAUCIONES

- Sólo para uso profesional *in vitro*.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- No utilizar el test si el envase primario se encuentra dañado.
- Las muestras deben considerarse potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso. Para evitar errores de contaminación, un nuevo test deberá utilizarse para la evaluación de cada muestra. Dispositivos de un solo uso.
- Los tests tras su utilización deben ser gestionados como residuos sanitarios (contenedor de residuos sanitarios).
- Los reactivos contienen conservantes. Debe evitarse cualquier contacto con la piel o las mucosas. Consultar fichas de seguridad, disponibles bajo petición.
- Los componentes proporcionados con el kit son aprobados para su uso con **Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba**. No se deben usar con componentes de otros kits comercializados.

- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio, llevar ropa de protección adecuada, usar guantes desechables, gafas de protección y mascarilla. No comer, ni fumar o beber en la zona de trabajo.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

El producto debe ser almacenado en el rango de temperatura ambiente o refrigerado (2-30°C/35.6-86°F) en su envase original sellado.

El producto es estable hasta la fecha de caducidad impresa en el envase.

No debe abrirse hasta el momento de su uso.

No congelar.

MATERIALES

MATERIAL SUMINISTRADO	MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADOS
<ul style="list-style-type: none"> • 10 tests/kit Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba • Instrucciones de uso. • 10 viales con diluyente para dilución de muestra. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recipiente para recogida de muestras. ▪ Guantes desechables. ▪ Cronómetro. ▪ Espátula.

RECOGIDA DE MUESTRAS

La cantidad de heces tomada debe ser suficiente: 1-2g o mL si la muestra es líquida. Las muestras deben ser almacenadas en un envase limpio y seco.

Las muestras pueden conservarse refrigeradas (2-8°C/35.6-46.4°F) durante 1-2 días antes de su uso. Si queremos conservar la muestra por un periodo prolongado, máximo 1 año, debe congelarse a -20°C/-4°F. En este caso, la muestra debe ser totalmente descongelada alcanzando la temperatura ambiente antes de usarse.

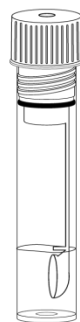
Homogeneizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

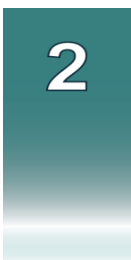
- 1 Abrir el tapón del vial con diluyente para dilución de muestra (figura 1) y usar la cuchara para tomar suficiente cantidad de muestra. Para muestras sólidas, insertar la cuchara en 4 puntos distintos de la muestra de heces (figura 2), quitar el exceso de muestra con la espátula (figura 3), y meter la muestra en el vial para dilución de muestra (figura 4). Para muestras líquidas tomar una cuchara llena de muestra (figura 3) e introducirla en el vial para dilución de muestra.
2. Cerrar el vial para dilución de muestra y agitarlo para diluir la muestra con el diluyente (figura 4).



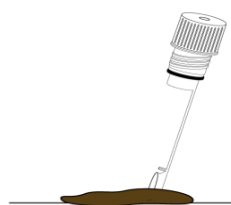
1



Vial dilución para de muestra.



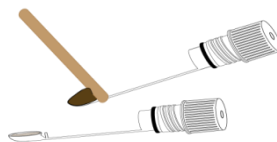
2



Insertar la cuchara en 4 zonas distintas de la muestra.



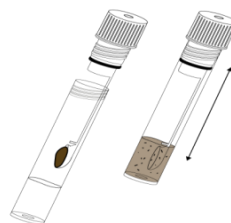
3



Eliminar el exceso de muestra con la espátula. Muestras líquidas: cuchara llena.



4



Poner la muestra en el vial, cerrar el tapón y agitar.

PROCEDIMIENTO

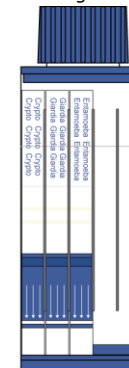
Antes de realizar la prueba los test, muestras, controles y diluyente deben alcanzar temperatura ambiente (15-30°C/59-86°F). No abrir el envase hasta el momento de la prueba.

1. Agitar el vial con la muestra para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar **Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba** de su envase antes de utilizarlo (figura 5).
3. Tomar el vial para dilución conteniendo la muestra diluida (figura 6), colocarlo dentro del tubo multiplex (figura 7). Enroscar el tapón del tubo multiplex (figura 8). La parte de abajo del vial para dilución de muestra se romperá y la solución diluyente+muestra alcanza la zona de muestra de las tiras (figura 9).
4. Dejar el tubo multiplex verticalmente en una superficie plana y leer el resultado a los **10 minutos**. No leer el resultado después de 10 minutos.

Si no se observa el avance de la cromatografía debido a la presencia de partículas sólidas (muestra no está homogeneizada), el proceso de migración puede detenerse en una o más tiras. En este caso, golpear la parte final del tubo multiplex en una superficie dura para permitir que la migración comience de nuevo.



5



Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba.



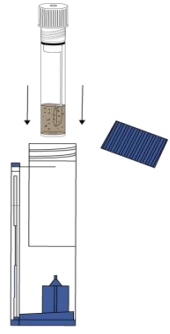
6



Vial con muestra diluida dentro.

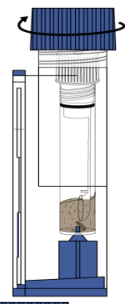


7



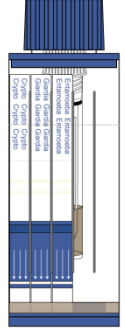
Introduce el vial con la muestra diluida dentro del multiplex.

8



Cierra el tapón y la parte final del vial ser romperá

9



Se produce la reacción. Leer el resultado a los 10 minutos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Tira A: Crypto, Tira B: Giardia, Tira C: Entamoeba

	<p>NEGATIVO</p> <p>Solo una línea verde en la zona de control (C) en las tres tiras (A, B y C)</p>	<p>No hay presencia de <i>Cryptosporidium</i>, <i>Giardia</i> y <i>Entamoeba (histolytica o dispar)</i>.</p>
--	---	--

	<p>POSITIVO</p> <p>Además de la línea verde (línea de control C), una línea roja aparece en cada tira, línea de test (T).</p>	<p>Hay presencia de <i>Cryptosporidium</i>, <i>Giardia</i> y <i>Entamoeba (histolytica o dispar)</i>.</p>
	<p>NEGATIVO</p> <p>Tira C (Entamoeba) → línea verde</p>	<p>Hay presencia de <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i>. Infección causada por <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i>.</p>
	<p>POSITIVO</p> <p>Tira A (Crypto) → líneas verde/roja Tira B (Giardia) → líneas verde/roja</p>	
	<p>NEGATIVO</p> <p>Tira B (Giardia) → línea verde</p>	<p>Hay presencia de <i>Cryptosporidium</i> y <i>Entamoeba (histolytica o dispar)</i>. Infección causada por <i>Cryptosporidium</i> y <i>Entamoeba (histolytica o dispar)</i>.</p>
	<p>POSITIVO</p> <p>Tira A (Crypto) → líneas verde/roja Tira C (Entamoeba) → líneas verde/roja</p>	
	<p>NEGATIVO</p> <p>Tira A (Crypto) → línea verde</p>	<p>Hay presencia de <i>Giardia</i> y <i>Entamoeba (histolytica o dispar)</i>. Infección viral causada por <i>Giardia</i> y <i>Entamoeba (histolytica o dispar)</i>.</p>
	<p>POSITIVO</p> <p>Tira B (Giardia) → líneas verde/roja Tira C (Entamoeba) → líneas verde/roja</p>	
	<p>NEGATIVO</p> <p>Tira B (Giardia) → línea verde</p>	<p>Hay presencia de <i>Cryptosporidium</i>. Infección causada por <i>Cryptosporidium</i>.</p>
	<p>POSITIVO</p> <p>Tira A (Crypto) → líneas verde/roja</p>	

	<p>NEGATIVO</p> <p>Tira A (Crypto) → línea verde Strip C (Entamoeba) → línea verde</p>	<p>Hay presencia de <i>Giardia</i>. Infección causada por <i>Giardia</i>.</p>
	<p>POSITIVO</p> <p>Tira B (Giardia) → líneas verde/roja</p>	
	<p>NEGATIVO</p> <p>Tira A (Crypto) → línea verde Strip B (Giardia) → línea verde</p>	<p>Hay presencia de <i>Entamoeba (histolytica o dispar)</i>. Infección viral causada por <i>Entamoeba (histolytica o dispar)</i>.</p>
	<p>POSITIVO</p> <p>Tira C (Entamoeba) → líneas verde/roja</p>	
<p>Cualquier otro resultado</p>	<p>Cualquier otro resultado inválido en A, en B o en C: se recomienda repetir la prueba con la misma muestra o test.</p>	

Notas: La intensidad de la línea roja de test en la región de la línea de resultados (T) variará dependiendo de la concentración de antígeno en la muestra.

Los resultados positivos detallados en la tabla anterior deberían ser confirmados con procedimientos de diagnóstico adicionales.

Simple o doble infección virica simultanea es más frecuente que infección triple o cuadruple.

Resultados inválidos: Ausencia total de las líneas de control (verdes) indica un resultado inválido, independientemente de la aparición o no de las líneas de tet (rojas). Procedimiento inadecuado, deterioro de reactivos, o volumen insuficiente de muestra podrían ser la causa del resultado inválido. Revisar el procedimiento y repetir el ensayo con un nuevo test. Si el problema continua, dejar de utilizar el kit y contactar con su distribuidor.

CONTROL DE CALIDAD

Existe un control interno del procedimiento incluido en **Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba**. Las líneas verdes aparecen en la ventana de resultados como control interno del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

LIMITACIONES

- No debe utilizarse **Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba** una vez abierto y transcurridas 2 horas.

- Un exceso de muestra puede dar resultados erróneos (aparición de líneas de color pardo). Diluir la muestra con el diluyente y repetir el test.
- Utilizar únicamente muestras frescas o muestras frescas congeladas sin conservantes ni fijadores.
- La intensidad de la línea del test puede variar dependiendo de la concentración de antígenos.
- No ha sido determinado el uso del test en muestras diferentes a las humanas.
- La calidad de **Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba** depende de la calidad de la muestra, por lo que se debe realizar una adecuada toma de muestras.
- Después de una semana de infección la presencia de parásitos eliminados en heces disminuye considerablemente por lo que es probable una menor concentración en la muestra. Se debe tomar la muestra de heces dentro de la primera semana de aparición de los síntomas.
- Los resultados positivos determinan la presencia de *Cryptosporidium* y/o *Giardia* y/o *Entamoeba* en muestras fecales. Un resultado positivo debería ser confirmado con otras técnicas de laboratorio adicionales (métodos bioquímicos, PCR, microscopía). La confirmación de una infección debería solamente ser hecha por un médico tras la evaluación de todos los hallazgos clínicos y de laboratorio y deben estar basados en la correlación entre los resultados y más observaciones clínicas.
- Un resultado negativo no se debe considerar como concluyente, puede darse que la concentración de antígenos en la muestra de heces sea inferior al límite de detección. Si los síntomas o la situación persisten, una determinación de *Cryptosporidium*, y/o *Giardia* y/o *Entamoeba* debería llevarse a cabo utilizando otras técnicas (por ejemplo microscopía).

VALORES ESPERADOS

La infección por *cryptosporidium* spp. se produce mayoritariamente en niños menores de 5 años, mayoritariamente en niños menores de 2 años. En personas inmunodeficientes, especialmente en individuos con VIH, la criptosporidiosis puede estar asociada a diarrea crónica, lo que puede llegar a poner en riesgo su vida.

En países en vías de desarrollo, alrededor de 200 millones de personas tienen síntomas de giardiasis, con unos 500000 nuevos casos detectados cada año. *Cryptosporidium* cuenta con hasta 20% de casos de diarrea infantil, mientras que la infección invasiva por *E. histolytica* afecta a 50 millones de personas en el mundo cada año, dando lugar a 40000-100000 muertes anuales.

Entre las principales infecciones por patógenos diarrogénicos, *Cryptosporidium* spp. es el que más muertes produce entre niños de menos de 5 años.

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

Sensibilidad y especificidad clínica

Se llevaron a cabo varias evaluaciones, con muestras de heces, con **Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba** y estos resultados fueron comparados con examen microscópico, PCR para las tiras de Crypto y Giardia y con qPCR test (VIASURE *Entamoeba histolytica* Real Time Detection Kit y VIASURE *Entamoeba dispar* Real Time Detection Kit, CerTest) para la tira de Entamoeba.

Los resultados se muestran a continuación:

		Examen microscópico/PCR		
		Positivo	Negativo	Total
Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba	Positivo	25	0	25
	Negativo	0	229	229
	Total	25	229	254
<i>Cryptosporidium</i>				

Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba (<i>Cryptosporidium</i>) vs Examen microscópico/PCR		
	Valor Medio	95% intervalo de confianza
Sensibilidad	>99%	86.3-100%
Especificidad	>99%	98.4-100%
VPP	>99%	86.3-100%
VPN	>99%	98.4-100%

		Examen microscópico/PCR		
		Positivo	Negativo	Total
Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba	Positivo	61	0	61
	Negativo	2	191	193
	Total	63	191	254
<i>Giardia</i>				

Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba (<i>Giardia</i>) vs Examen microscópico/PCR		
	Valor Medio	95% intervalo de confianza
Sensibilidad	97%	89.0-99.6%
Especificidad	>99%	98.1-100%
VPP	>99%	94.1-100%
VPN	99%	96.3-99.9%

		VIASURE <i>Entamoeba histolytica</i> Real Time Detection Kit		
		Positivo	Negativo	Total
Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba	Positivo	4	1	5
	Negativo	1	107	108
	Total	5	108	113
<i>Entamoeba</i>				

Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba (<i>Entamoeba</i>) vs VIASURE <i>Entamoeba histolytica</i> Real Time Detection Kit		
	Valor Medio E. histolytica	95% intervalo de confianza
Sensibilidad	80%	28.4-99.5%
Especificidad	99%	94.9-100%
VPP	80%	28.4-99.5%
VPN	97%	94.9-100%

		VIASURE <i>Entamoeba dispar</i> Real Time Detection Kit		
		Positivo	Negativo	Total
Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba	Positivo	15	1	16
	Negativo	6	107	113
	Total	21	108	129
<i>Entamoeba</i>				

Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba (<i>Entamoeba</i>) vs VIASURE <i>Entamoeba dispar</i> Real Time Detection Kit		
	Valor Medio E. dispar	95% intervalo de confianza
Sensibilidad	71%	47.8-88.7%
Especificidad	99%	94.9-100%
VPP	94%	69.8-99.8%
VPN	95%	88.8-98.0%

		VIASURE <i>Entamoeba histolytica</i> Real Time Detection Kit and VIASURE <i>Entamoeba dispar</i> Real Time Detection Kit		
		Positivo	Negativo	Total
Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba	Positivo	19	2	21
	Negativo	7	214	221
	Total	26	216	242
<i>Entamoeba</i>				

Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba vs VIASURE <i>Entamoeba histolytica</i> Real Time Detection Kit and VIASURE <i>Entamoeba dispar</i> Real Time Detection Kit		
	Valor Medio E. histolytica+ E. dispar	95% intervalo de confianza
Sensibilidad	73%	52.2-88.4%
Especificidad	99%	96.7-100%
VPP	90%	69.6-98.8%
VPN	97%	93.6-98.7%

Los resultados mostraron que **Vitassay Crypto+Giardia+Entamoeba** presenta una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Cryptosporidium*, *Giardia* y *Entamoeba* (*histolytica* o *dispar*).

Reacciones cruzadas

No se detectaron reacciones cruzadas con los siguientes patógenos gastrointestinales ocasionalmente presentes en las heces:

<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Giardia lamblia</i> (Tira A y C)	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Cryptosporidium parvum</i> (Tira B y C)	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Salmonella paratyphi</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Entamoeba</i> (Tira A y B)	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

BIBLIOGRAFÍA

1. TAHMINA AHMED; HAMIDA KHANUM; MUHAMMED SALAH UDDIN; PRIYANKA BARUA; TUHINUR ARJU; MAMUN KABIR; RASHIDUL HAQUE. "Entamoeba Histolytica, Giardia Lamblia and Cryptosporidium spp. infection in children in an urban slum area of Bangladesh". Bioresearch Communications, Vol. 02, issue 01, January 2016, pp. 175-181.

2. MARIA J. FLECHA; CYNTHIA M. BENAVIDES; GABRIEL TISSIANO; ABRAHAM TEFAMARIAM; JUAN CUADROS; AIDA DE LUCIO; BEGOÑA BAILO; LOURDES CANO; ISABEL FUENTES; DAVID CARMENA. "Detection and molecular characterization of Giardia duodenalis, Cryptosporidium spp. and Entamoeba spp. among patients with gastrointestinal symptoms in Gambo Hospital, Oromia region, southern Ethiopia". Tropical Medicine and International Health, vol. 20, nº 9, September 2015, pp. 1213-1222.

3. MARIT G. TELLEVIK; SABRINA J. MOYO; BJORN BLOMBERG; TORUNN HJOLLO, SAMUEL y. MASELLE; NINA LANGELAND; KURT HANEVIK. "Prevalence of Cryptosporidium parvum/hominis, Entamoeba histolytica and Giardia lamblia among Young Children with and without Diarrhea in Dar es Salaam, Tanzania". PLoS Negl Trop Dis 9(10): e0004125, October 2015.

SÍMBOLOS PARA REACTIVOS Y PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

 IVD	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Almacenar en lugar seco
	Consultar las instrucciones de uso		Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad		Fabricante
	Número de lote		Contiene <n> test
DIL	Diluyente de muestra		Número de referencia



