

Prueba Inmunocromatográfica Cualitativa para la Detección de Antígenos de Giardia en heces Humanas

Solo para diagnóstico In Vitro.

*Para uso exclusivo en laboratorios clínicos y en hospitales
Conservar entre 2°C a 30°C*

STICK GIARDIA / SIMPLE GIARDIA

Test inmunocromatográfico en un solo paso para la detección de antígenos de Giardia en heces.

FINALIDAD PREVISTA

El inmunoensayo cromatográfico Stick Giardia y Simple Giardia es un procedimiento para la detección cualitativa in vitro de antígenos de Giardia en heces.

Giardia intestinalis, también llamada Giardia lamblia, es un parásito protozooario gastrointestinal de diversas especies, (mamíferos, aves, etc.) causante de un cuadro clínico que varía de portador sin síntomas hasta enfermedad diarreica aguda o de larga duración, especialmente en los niños.

Ambos parásitos se encuentran en todo el mundo, especialmente en zonas con malas condiciones sanitarias. Giardia lamblia infecta a través de la ingestión de sus quistes, los cuales pueden permanecer viables incluso en agua clorada. Al llegar al duodeno, cada quiste libera hasta 4 trofozoítos flagelados (forma invasiva) que colonizan las células del duodeno y yeyuno proximal.

Los síntomas aparecen de 1-3 semanas después del contagio y ocurren tras un período de incubación cercano a los 8 días. La forma de presentación más frecuente se caracteriza por diarrea, pérdida de peso, dolor abdominal tipo cólico y detención del crecimiento y desarrollo. El inicio de los síntomas puede ser abrupto o gradual; la enfermedad puede estar autolimitada o producir un cuadro de diarrea severa con mal absorción intestinal. En el caso humano son comunes las alteraciones de las funciones digestivas en los niños con síntomas persistentes, tales como mal absorción de azúcares (especialmente disacáridos como sacarosa y lactosa), grasas, y vitaminas liposolubles. La intolerancia a la lactosa es común después de la infección aguda y puede aparentar recaída o reinfección. Raramente los trofozoítos invaden las paredes intestinales causando diarrea inflamatoria y fiebre, tampoco está documentado que produzcan sustancias tóxicas.

El test está basado en la captura inmunológica de micropartículas coloreadas durante su paso a través de una membrana sobre la que se ha inmovilizado el anticuerpo monoclonal.

FUNDAMENTO

El test Simple Giardia o Stick Giardia utiliza anticuerpos monoclonales específicos frente a Giardia lamblia que detectan todas las formas del ciclo vital del parásito.

Se utilizan microesferas rojas unidas covalentemente a un anticuerpo monoclonal anti-Giardia lamblia, y microesferas azules como control del test.

El parásito presente en las muestras de heces reacciona con las

partículas de látex que están recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos frente al antígeno. Este complejo de partículas de látex/anticuerpos/parásito migra por un proceso cromatográfico en la zona de reacción. En esta zona hay anticuerpos anti-Giardia que reaccionan con el complejo partículas de látex/anticuerpos/parásito. Esta reacción origina la formación de una línea roja. Estas líneas se usan para interpretar el resultado, a los cinco minutos de incubación a temperatura ambiente.

REACTIVOS

Materiales abastecidos con el equipo de prueba

1. Dispositivos de reacción. El número de dispositivos de reacción del kit se encuentra indicado en la etiqueta externa del kit tras el símbolo
2. Vial con el tampón de dilución. Se suministra el volumen total de tampón de dilución para todas las tiras en un solo vial.

Materiales requeridos pero no abastecidos

- Tubos de ensayo
- Pipetas graduables
- Puntas de pipetas.

PRECAUCIONES

1. Las muestras de los pacientes (heces) pueden contener agentes infecciosos y deberán ser tratadas y desechadas como materiales biológicos potencialmente peligrosos.
2. El tampón contiene azida de sodio como agente antimicrobiano. Evitar el contacto directo con la piel y las mucosas. Desechar de forma apropiada. No usar el tampón si manifiesta indicios de contaminación o precipitación.
3. No comer, beber, fumar, almacenar o preparar alimentos en la zona donde se manejan los reactivos y las muestras.
4. Llevar guantes desechables al manejar las muestras. Lavarse bien las manos al acabar de trabajar
5. No intercambiar los componentes de kits con distinto número de lote.
6. Utilizar todos los reactivos únicamente in vitro.
7. Antes de usarlos, dejar que todos los componentes del kit y muestras alcancen la temperatura ambiente, pues reactivos y/o muestras fríos pueden reducir la funcionalidad del test. Se recomiendan de 20 a 30 minutos para alcanzar la temperatura ambiente.
8. No usar los componentes del kit después de las fechas de caducidad.
9. En caso de rotura del envase, el producto puede ser utilizado si ninguno de los componentes ha sido dañado.
10. Es importante añadir la cantidad correcta de muestra (4-5 gotas de suspensión). Si es inferior a la indicada puede ser que no se realice la cromatografía porque no llegue muestra a la zona de reacción, si es superior pueden aparecer líneas marrones en vez de rojas y azules.
11. El producto usado debe desecharse conforme a la legislación vigente.

12. No usar el test si aparece alguna línea de color en la zona de resultados antes de empezar a usarlo.
13. Es importante tomar la cantidad de hez adecuada: 30- 50 mg de heces sólidas ó 100 ul de heces líquidas. Un exceso de muestra impide la correcta cromatografía.
14. En el caso del producto Stick envasado en tubo es importante que se vuelva a cerrarlo de manera inmediata una vez sacada la tira reactiva dado que una humedad ambiental e evada podría dañar al resto de tiras que permanecen en el interior del tubo.

ALMACENAMIENTO

Se puede conservar a cualquier temperatura comprendida entre 2 y 30°C (se puede almacenar en refrigeración). Su fecha de caducidad está impresa en la envoltura.

MUESTRAS

Se deben recoger las muestras fecales, en un contenedor estéril apropiado, tan pronto como sea posible después del comienzo de los síntomas. Ha de intentarse que la muestra sea representativa.

Las muestras pueden guardarse en el refrigerador (4°C aproximadamente.) durante 1 o 2 días antes de ser analizadas. Para una conservación más prolongada, deben guardarse en el congelador a -20°C sin manipulación previa.

En este caso, la muestra será descongelada totalmente, llevada a temperatura ambiente y homogeneizada antes de analizarla.

PROCEDIMIENTO

Importante: Tomar heces de al menos tres sitios diferentes de la muestra con el fin de obtener una muestra lo más representativa posible.

1. Tomar un tubo de ensayo por muestra. Añadir aproximadamente 1-1.5 mL de tampón
2. Seguidamente, tomar una pequeña cantidad de heces (30– 50 mg) y resuspenderla en el tampón. Si se utiliza un hisopo sumergir en el tampón y presionar la torunda contra las paredes del tubo haciéndola rodar. Si las heces son líquidas coger con ayuda de una pipeta 100 microlitros de muestra.
3. Agitar vigorosamente para lograr una suspensión de la muestra en el diluyente (alternativamente, agitar en el Vortex durante 15 segundos).
4. Esperar al menos 3 minutos hasta que las partículas sólidas se hayan depositado en el fondo o centrifugar por un minuto a 700 xg, y con la ayuda de una pipeta transferir 150 microlitros del sobrenadante a otro tubo de ensayo.
5. Sacar la tira de reacción de la bolsa de aluminio. Desechar la bolsita de desecante puesto que sólo sirve para preservar el test de la humedad y no se emplea en la realización del test.
6. Introducir la tira reactiva en el 2º tubo de ensayo, con las flechas indicando hacia el fondo del tubo. **IMPORTANTE: el líquido no debe nunca alcanzar la zona donde están las flechas. Si fuese necesario, utilizar un tubo mas largo o reducir la cantidad de muestra.**
7. Leer el resultado a los 5 minutos en la zona central blanca de la tira.

Nota: la tira puede también introducirse en el primer tubo o vial, siempre que éste sea lo suficientemente grande para que el líquido no alcance la zona donde están las flechas. No obstante, raras veces ocurre que al utilizar una muestra muy concentrada la absorción se ve dificultada. Alternativamente la tira se puede sumergir por 10 segundos en el primer tubo, evitando sobrepasar la punta de las flechas y luego dejarla reaccionar sobre una superficie horizontal.

LECTURA DE RESULTADOS

Código de interpretación de las imágenes de las tiras.

C: Giardia lamblia

N: Negativo



- **NEGATIVO:** Aparece una sola línea AZUL en la zona de resultados (en SIMPLE alineada con la letra “C” (control) marcada en la carcasa). Siempre debe aparecer esta línea.
- **POSITIVO:** Aparecen una línea AZUL y otra ROJA/ROSA en la zona de resultados (en la carcasa alineada con la letra “T” (test) marcada en la carcasa). La intensidad puede variar según la concentración presente de antígeno.
- **INVÁLIDO:** Si no aparece la línea azul, el test será inválido porque no se ha procedido correctamente, porque los reactivos se han deteriorado o por haber añadido una cantidad incorrecta de muestra. Repita el test con un nuevo dispositivo de reacción. Toda línea que por la naturaleza de la muestra pueda aparecer pasados 5 minutos no tendrá valor diagnóstico.

El diagnóstico final no se debe basar sólo en el resultado de un test. Se deberá fundamentar en la correlación de los resultados del test con otros datos adecuados y con la sintomatología clínica.

CONTROL DE CALIDAD

Si no aparece ninguna línea azul el test es inválido, ya sea por que se realizó incorrectamente o por que los reactivos se han deteriorado. En este caso, repetir el análisis ciñéndose estrictamente al protocolo de trabajo detallado en estas hojas de instrucciones.

ADVERTENCIA: Se recomienda la inclusión de un control de resultado conocido para asegurar que los datos obtenidos son correctos.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. El test debe usarse solo para la detección de antígenos de Giardia en heces.
2. El test es cualitativo y no debe hacerse ninguna interpretación cuantitativa del resultado en relación directa a la intensidad de la línea positiva.
3. Mas de 200 muestras fueron evaluadas para asegurar el correcto funcionamiento del test. La correlación de resultados con otras técnicas (ELISA) fue excelente. Sin embargo, no se deben excluir interferencias en el funcionamiento del test.
4. Con un exceso de muestra pueden aparecer líneas marrones en vez de rojas y azules, o bien no aparecer las líneas test y control al no poder cromatografiar correctamente. Las líneas marrones no tienen ningún valor diagnóstico. En este caso se debe repetir el test con una cantidad menor de muestra o diluir el extracto ya hecho.
5. No se ha observado ninguna reacción cruzada con otras sustancias durante la evaluación del test. Un resultado negativo no excluye totalmente una posible infección por Giardia lamblia. La importancia de los resultados debe ser evaluada con relación a los síntomas clínicos del paciente.
6. El análisis de algunas muestras puede dar líneas con colores indefinidos, causados en la mayoría de los casos por muestras

negativas. Cuando aparezcan estas líneas de coloración indefinida, debe repetirse el test. En el caso de obtenerse el mismo resultado se sugiere realizar el análisis con otro método analítico.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA ENSAYO

ENSAYO 1

Se toma como producto de referencia un producto de la técnica ELISA con marcado CE. Se evalúa el Simple Giardia/ Stick Giardia frente a un ELISA para detección de antígenos de Giardia. Los resultados fueron:

		ELISA Giardia Ridascreen	
		+	-
Stick Giardia Operon	+	26	0
	-	1	53

Porcentaje concordancia: $100\%[(26+53)/80] = 98,8\%$.

Concordancia sensibilidad estimada:

$100\%[26 / (26+1)] = 96,3\%$.

Concordancia especificidad estimada:

$100\%[53 / (0+53)] = >99,9\%$.

ENSAYO 2

Se toma como técnica de referencia la detección del parásito por microscopía. Se evalúa el Simple Giardia / Stick Giardia para detección de antígenos de Giardia frente a microscopía.

Los resultados fueron:

		Microscopía	
		+	-
Stick Giardia Operon	+	15	1
	-	0	53

Porcentaje concordancia: $100\%[(15+53)/69] = >98,5\%$

Concordancia sensibilidad estimada:

$100\%[15 / (15+0)] = >99,9\%$

Concordancia especificidad estimada:

$100\%[53 / (1+53)] = >98\%$.

PRECISIÓN INTRAENSAYO

Se ensayan cinco réplicas de cada concentración de la curva de sensibilidad con un lote y se obtienen los mismos resultados.

REPRODUCIBILIDAD

Con 1 lote de producto, se realizan cuatro réplicas de la curva de sensibilidad a lo largo de diez días consecutivos. Sólo se aprecia una diferencia menor a una dilución $\frac{1}{2}$, asumible y tolerable la técnica inmunocromatográfica.

PRECISION INTERLABORATORIO

Tres laboratorios-operadores distintos ensayan esas mismas muestras manteniendo precisiones y concordancias elevadas. Sólo se aprecia una diferencia de una dilución $\frac{1}{2}$, asumible y tolerable por la técnica inmunocromatográfica.

PRECISION INTERLOTE

Con 3 lotes de producto se realiza una curva de sensibilidad por duplicado. El análisis lo realiza una persona y en el mismo día. Sólo se aprecia una diferencia menor a una dilución $\frac{1}{2}$, asumible y tolerable por la técnica inmunocromatográfica.

EFEECTO HOOK

No se ha dispuesto de un estándar de concentración conocida, pero el análisis de la curva de sensibilidad 3 partiendo de la máxima concentración posible del estándar interno no ha revelado la existencia de efecto hook.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Las sustancias descritas en la tabla, y a la concentración indicada no dieron lugar a interferencia en el resultado. Se utilizó un lote para realizar el estudio.

Metronidazol 1,2 mg/mL

Racecadotril 0,72 mg/mL

Loperamida 24 µg/mL

Atropina Braun 1,68 µg/mL

Cimetidina 1,92 mg/mL

Omeprazol 0,144 mg/mL

Neomicina 6,62 mg/mL

Ampicilina 7,2 mg/mL

Ibuprofeno 5,76 mg/mL

Ácido acetilsalicílico 4,8 mg/mL

Sacarosa 8 mg/mL

Sangre 10% (v/v)

MICROORGANISMOS INTERFERENTES

Los microorganismos indicados no dieron lugar a interferencia en el resultado.

Entamoeba coli

Blastocystis hominis

Iodamoeba bütschlii

Chilomastix mesnili

Endolimax nana

Huevos de *Taenia spp*

Giardia lamblia

Helicobacter pylori

Campylobacter jejuni

Rotavirus

Adenovirus

Astrovirus

BIBLIOGRAFÍA

- García L.S. y Shimizu R.Y. "Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay". *Journal of Clinical Microbiology* (2000). Vol 38, nº 3, p. 1267-1268.
- Sharp S.E. et al. "Evaluation of the Triage Micro Parasite Panel for detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* inpatient stool specimens". *Journal of Clinical Microbiology* (2001). Vol 39, nº 1, p. 332-334.
- Katanik M.T. et al. "Evaluation of ColorPac *Giardia/Cryptosporidium* rapid assay and ProSpecT *Giardia/Cryptosporidium* microplate assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in fecal specimens". *Journal of Clinical Microbiology* (2001). Vol 39, nº 12, p. 4523-4525.