

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL
ECUADOR**

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOANÁLISIS CLÍNICO**

**” Identificación etiológica de la enfermedad diarreica
aguda (EDA) en niños de dos meses a cinco años de edad
en el servicio de emergencia de la Novaclínica Santa
Cecilia en el periodo de mayo a diciembre del 2013”**

Jhoanna Patricia Puruncajas Maza

Director: Dr. Francisco Pérez Pazmiño

Quito, 03 de marzo del 2015

Dedicatoria

A mi padre, por enseñarme mis valores, principios, carácter, perseverancia y coraje para conseguir mis objetivos, porque ha sacrificado sus sueños para que yo pueda cumplir con los míos, porque con tu bondad y esfuerzo me inspiraste a ser mejor para ti.

A mi madre, quien tiene algo de Dios por la inmensidad de su amor y mucho de ángel por ser mi guarda, a ella quien me enseñó la dulce fortaleza para aceptar derrotas y del sutil coraje para derribar miedos, porque has sido, eres y serás el pilar de mi vida.

A mis hermanos, porque juntos hemos aprendido a vivir y crecer como cómplices día a día, por brindarme el incondicional abrazo que motiva y recuerda que detrás de cada detalle existe el suficiente alivio para empezar nuevas búsquedas, porque serán mis amigos incondicionales para toda la vida.

A mi novio, por llegar en el momento preciso, por tocar mi corazón.

A toda mi familia y amigos y a quienes recientemente se suman a mi vida para hacerme compañía con sus sonrisas de ánimo, todo lo que soy es gracias a todos ustedes.

Agradecimientos

A Dios por existir así, aquí y ahora

Un especial agradecimiento al Dr. Francisco Pérez, al Dr. Carlos Lemos y al Ing. Fernando Aguas quienes me ayudaron en todo este proceso, por sus consejos y amistad, generando de hoy en adelante mi lealtad, admiración y gratitud.

INDICE

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DEL ECUADOR	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
CAPÍTULO 1	5
1.1. INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO 2	15
2.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA DIARREA EN LA INFANCIA	15
2.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DIARREICA AGUDA	16
2.3. MECANISMOS DE ACCIÓN	19
2.4. FACTORES DE RIESGO PARA LA GASTROENTERITIS	23
CAPÍTULO 3	25
3.1. DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO	25
3.1.1. ETAPA PREANALÍTICA	26
3.1.1.1. MATERIAL	27
3.1.1.2. ALIMENTACIÓN	27
3.1.1.3. TOMA DE LA MUESTRA	28
3.1.2. ETAPA ANALÍTICA	29
3.1.2.1. COPROPARASITARIO	29
3.1.2.2. DETECCIÓN DE ROTAVIRUS EN HECES	37
3.1.2.3. ANÁLISIS DE SANGRE OCULTA EN HECES	38
3.1.2.4. INVESTIGACIÓN DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES	39
3.1.3. ETAPA POSTANALÍTICA	42
4.1. RESULTADOS	43
4.2. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	44

4.3. DISCUSIÓN	52
4.4. CONCLUSIONES	55
4.5. RECOMENDACIONES	56
5. BIBLIOGRAFÍA.....	57
6. ANEXOS	59

RESUMEN

La diarrea es uno de los signos de enfermedad más común en los niños, potencialmente es una enfermedad seria dependiendo de la edad, del estado nutricional del niño y de la pérdida de agua y electrolitos que genere. Una de las consecuencias más importantes es la deshidratación grave con necesidad de hospitalización, especialmente en niños desnutridos o inmunodeficientes. Actualmente esta enfermedad ocupa la segunda causa de mortalidad infantil a nivel mundial aunque es totalmente prevenible y tratable.

Con la caracterización de las heces mediante pruebas de laboratorio, se busca como objetivo principal identificar y confirmar el agente etológico causante de la enfermedad diarreica aguda con la finalidad de ser un soporte diagnóstico para la atención temprana de niños desde dos meses de edad hasta cinco años. La identificación del agente causal mediante coproparasitario, técnicas inmunocromatográficas y pruebas complementarias como polimorfonucleares y sangre oculta que al ser de bajo costo y rápidas brindarán una mejor atención en los servicios de salud y de atención primaria.

El presente estudio se realizó usando un diseño descriptivo transversal, en el servicio de emergencia de la Novaclínica Santa Cecilia, ubicada en Quito, en el periodo de mayo a diciembre del 2013, usando un muestreo aleatorio simple, de acuerdo a esto y después del análisis de las heces fecales obtenidas de 267 niños se encontró, que la mayor parte de los casos de enfermedad diarreica aguda son de origen viral, producido por rotavirus (36.98%), seguido por los cuadros diarreicos de origen parasitario, especialmente causados por quistes de *Entamoeba histolytica*. Ninguna de las muestras tuvo presencia significativa de mononucleares y no se evidenció la presencia de helmintos como causantes del cuadro diarreico.

ABSTRACT

Diarrhea is one of the most common symptoms of illness in children, is a potentially serious disease depending on age, nutritional status of children and the loss of water and electrolytes to generate. One of the most important effects is severe dehydration requiring hospitalization, especially in malnourished or immunocompromised. Currently this disease is second leading cause of infant mortality worldwide being entirely preventable and treatable.

Despite its frequency, only a few studies in our country analyzed the incidence of diarrhea in non-hospitalized children. With the characterization of stool laboratory it is likely to identify and confirm the cause of acute diarrheal disease in order to be a diagnosed for the early intervention support for children from two months old to five years ethological agent.

The identification of the causative agent by stools and immunochromatographic techniques and tests such as polymorphonuclear leukocytes and occult blood that being inexpensive and fast provide better care in health services and primary care.

The present study was conducted using a descriptive cross-sectional design in emergency service Novaclínica Santa Cecilia, located in Quito, in the period from May to December 2013, using a simple random sampling, according to this and after analysis of stool obtained from 267 children were found, the major cause of acute diarrheal disease is caused by bacteria, still prevalent in 50.68% of cases, followed by infection with rotavirus (36.98%) and finally of parasitic origin, especially caused by *Entamoeba histolytica* cysts. None of the samples had significant presence of mononuclear and not the presence of helminths as causes of diarrheal illness was evident.

CAPÍTULO 1

1.1. INTRODUCCIÓN

La importancia de la enfermedad diarreica aguda radica en que es la segunda causa de muerte de niños menores de cinco años, y ocasiona el deceso de 760 000 mil niños cada año (OMS, 2013).

Las enfermedades diarreicas son causa principal de mortalidad y morbilidad en la niñez en el mundo, y por lo general son consecuencia de la exposición a alimentos o agua contaminados. En todo el mundo, 780 millones de personas carecen de acceso al agua potable, y 2 500 millones a sistemas de saneamiento apropiados. (OMS, 2013)

En países en vías de desarrollo, como el nuestro, los niños menores de cinco años sufren, en promedio, tres episodios de diarrea al año. Cada episodio priva al niño de nutrientes necesarios para su crecimiento. En consecuencia, la diarrea es una importante causa de malnutrición, y los niños en este estado son más propensos a padecer enfermedades a futuro.

Pese a que son enfermedades prevenibles y tratables, en América Latina y el Caribe, 5.1% de las muertes en menores de 5 años son debidas a diarrea y deshidratación. Sin embargo, en 11 países de la Región la proporción de los niños y niñas a esta edad que mueren por diarrea sigue siendo superior al promedio regional. (OPS, 2008)

En el estudio “Mortalidad por enfermedades infecciosas intestinales en menores de cinco años. Argentina bienio 2008-2009” hubieron 125 defunciones de menores de cinco años con infecciones intestinales en el año 2009, siendo el 70% antes del primer año de edad, es decir que los grupos más afectados son aquellos que aún no han completado su desarrollo

inmunológico, siendo la edad una variable importante a tomar en cuenta al momento de dar atención prioritaria y tratamiento en casos de diarrea aguda. (OPS, 2008)

En la Región de las Américas y el Caribe, esta patología evidencia la inequidad que existe en lo referente a la salud al ocupar uno de los primeros lugares de causas de muerte comparada con otras regiones del mundo, especialmente en América del Sur donde existe una relación 50 veces mayor de muertes por diarrea que en los países del norte, además se encuentra entre las cinco causas de muerte en todas las edades en 17 países y constituye la primera causa de muerte en cinco y la segunda en cuatro de ellos. (Ministerio de Salud de la Nación Argentina, 2011)

Actualmente se estima que la enfermedad diarreica aguda constituye entre el 60 y el 80% del motivo de consultas pediátricas en los servicios de salud en América Latina, siendo en general un problema de salud pública, que necesita ser atendido debido al gran número de casos que se presentan. De acuerdo a las Estadísticas Sanitarias Mundiales 2012, en el Ecuador, la tasa de mortalidad según la edad, por causas transmisibles dentro de las que se encuentra EDA es de 105 por 100 000 habitantes. Dentro de la distribución de causas de muerte en menores de 5 años, la diarrea ocupó el 4% en el año 2010. (Organización Mundial de la Salud, 2012).

En la actualidad la neumonía y las enfermedades diarreicas son las dos principales causas de muerte entre los niños menores de 5 años en el Ecuador. De acuerdo a los datos del INEC, en el año 1990 la tasa de mortalidad de menores de cinco años fue de 43.1 por cada mil nacidos vivos, en el año 2004, de 21.8; es decir, 1.9 veces menor y en el año 2010, la mortalidad infantil fue de 19.65 muertes por cada 1000 niños nacidos vivos. Sin embargo, a pesar de esta disminución y de acuerdo a los datos del Banco Mundial esta tasa en el 2012 estuvo en 23 por cada 1000 niños nacidos vivos. (El Banco Mundial, 2013)

Con los valores estadísticos mencionados es preciso que, cuando se presente el cuadro diarreico, se optimice del tiempo en la identificación del agente causal, generando una disminución en el tiempo de reacción y tratamiento en la enfermedad diarreica aguda.

En los países en desarrollo, como es el caso del Ecuador, la enfermedad diarreica aguda además de ser una de las principales causas directas de muerte en niños menores de 5 años, es una de las causas más frecuentes que desencadenan el proceso de pérdida de la velocidad de crecimiento, que si no es corregida oportunamente, conduce a cuadros progresivos de desnutrición, lo que a su vez, propicia las condiciones para que prospere la morbilidad y mortalidad en la niñez. En el Ecuador, el 23% de menores de cinco años de edad, presenta desnutrición crónica. Los hijos de madres con menos acceso a la educación, especialmente en las zonas rurales, son los que se encuentran en mayor peligro. La prevalencia de enfermedades diarreicas y respiratorias con un índice alto en menores de cinco años se concentra específicamente en las zonas rurales de la Sierra y la Amazonía y va del 30% a más del 50% respectivamente. (Toca, 2012)

La prevalencia de la Enfermedad Diarreica Aguda en menores de 5 años está en 21%, de acuerdo al informe presentado sobre la provincia de Pichincha y la ciudad de Quito, de los datos obtenidos en la “Encuesta demográfica y de salud materna e infantil” (Endemain, 2004)

Además en un estudio realizado en la ciudad de Riobamba, en el área de consulta externa y emergencia en el año 2008, en el mes de Enero a Diciembre se presentaron 2.231 casos de enfermedad diarreica aguda. En el año 2009 en el mismo periodo se presentaron 1.344 y en el periodo Marzo- Noviembre 2010 se registraron 1,961 niños con EDA. (Cabezas Quinzo, 2011). En general, en los estudios realizados en el país si bien se conoce el número de casos que se presentan de enfermedad diarreica aguda se desconoce el agente causal más frecuente.

Es importante tomar en cuenta que los datos estadísticos que se presentan son de casos específicamente de enfermedad diarreica aguda, ya que en los menores de cinco años donde ya está presente la ablactación también pueden presentar síndromes de malabsorción, la diferencia principal entre estos dos tipos de patologías es que los segundos, al ser repetitivos y sin causa aparente, afectan con el tiempo el peso y más gravemente la talla. Los síndromes de malabsorción se debe en su mayoría a déficit enzimáticos, y trastornos inmunes, etc. (Kliegman, Jenson, Stanton, & Behrman, 2010)

Para lograr una disminución notable de la morbilidad y mortalidad por enfermedad diarreica aguda en nuestro país, es conveniente y necesario primero conocer la situación actual de esta patología en la población infantil y además determinar los agentes patógenos más comunes, ya que estos datos pueden servir de guía para los centros de atención primaria de salud y a nivel familiar y comunitario. La identificación rápida y oportuna por parte del servicio de laboratorio, mediante el uso de técnicas fáciles y de bajo costo, permitirá que en conjunto con todo el equipo de salud se ayude a disminuir la gravedad de los casos de EDA y por qué no a ayudar a cumplir con El Objetivo de Desarrollo del Milenio propuesto por la OMS, en reducir desde 1990 hasta el 2015 a 14,4 defunciones por cada mil nacidos vivos antes de los cinco años.

La enfermedad diarreica aguda tiene una alta incidencia en el Ecuador, al ser un país multicultural, multiétnico y donde la población infantil es alta, es importante que además de los datos antes mencionados también enfocarse en los factores de riesgo y medidas de prevención para la enfermedad diarreica aguda, ya que el conocer las condiciones higiénicas sanitarias que influyen en su aparición, así como, los aspectos sociales permitirán evitar esta patología que es totalmente prevenible y tratable.

Esta investigación tiene como objetivo principal identificar los agentes etiológicos más frecuentes causantes de enfermedad diarreica aguda en niños de dos meses hasta cinco años de edad, así como su incidencia y las características que producen en las deposiciones, tomando en cuenta la edad en la que se presenta.

Al determinar las características de las heces de acuerdo al agente etiológico presente, se busca explicar y entender la naturaleza y comportamiento de los diferentes agentes enteropatógenos, que en conjunto con la clínica de la enfermedad y el diagnóstico rápido de laboratorio permitirán una acción terapéutica rápida en el niño, disminuyendo así las complicaciones del síndrome diarreico agudo como es la deshidratación grave. (Organización Mundial de la Salud, 2013)

Los objetivos planteados dentro del estudio son:

- Objetivo general

Establecer el agente etiológico parasitario y la frecuencia de rotavirus en la enfermedad diarreica aguda en niños menores de cinco años y mayores a dos meses de edad en el servicio de emergencia de la Novaclínica Santa Cecilia en el periodo de mayo a diciembre del 2013.

- Objetivos específicos

- Relacionar las características de las heces con su causa etiológica
- Correlacionar el agente etiológico de EDA con los meses de edad de los niños.
- Establecer la presencia de polimorfonucleares y mononucleares de acuerdo a la causa de la diarrea aguda.
- Determinar la presencia de sangre oculta y su relación con el patógeno identificado
- Conocer mediante el coproparasitario el enteroparásito patógeno
- Especificar la incidencia de rotavirus mediante la técnica inmunocromatográfica.

En cuanto al procedimiento técnico, para este estudio se realizará el examen coproparasitario que al ser rápido, fácil y de bajo costo permite una identificación de los agentes patógenos causantes de diarrea aguda en los niños de manera más rápida que mediante el coproparasitario seriado o por concentración, si bien es una técnica de baja sensibilidad en relación a las técnicas antes mencionadas, es el análisis que más se usa en práctica pública y privada ante la sospecha de EDA y es el principal examen que se solicita al laboratorio, sobre todo en los casos de sospecha de enteroparásitos que son fácilmente identificables dentro de este análisis. (Cabezas Quinzo, 2011)

El examen coproparasitario es un conjunto de técnicas diagnósticas que permiten la identificación de enteroparasitosis. Su eficacia y sensibilidad para establecer un diagnóstico correcto aumenta dependiendo de la adecuada indicación y preparación de la muestra, los datos clínicos y antecedentes de interés que son brindados por el médico y de su correcta y completa ejecución del examen microscópico como macroscópico. Otras técnicas

complementarias como coloraciones, pruebas seriadas o especiales en las heces fecales contribuyen a completar el esquema del examen en circunstancias específicas como en casos endémicos o en caso inusuales etc. (Salvatella & Eirale, 1996)

Dentro de las pruebas complementarias, como es la determinación de polimorfonucleares y sangre oculta, la finalidad es que ayuden como técnicas suplementaria cuando el patógeno no sea fácilmente identificable, ya que al conocer la historia natural de la enfermedad que producen los diferentes agentes patógenos en menores de cinco años hasta dos meses de edad, los resultados obtenidos de estos análisis, tanto positivos o negativos ayuden a dar más fuerza a la sospecha diagnóstica. (Medicine , 2010)

Otro de los agentes patógenos más frecuentes que afectan este grupo de edad es el rotavirus, que es la causa más común de diarrea severa en niños, y produce aproximadamente 55,000 hospitalizaciones por año en los Estados Unidos, además de la muerte de aproximadamente 600,000 niños a nivel mundial. La infección por rotavirus es la causa más importante de las diarreas en niños menores de cinco años en el mundo, porque puede provocar desde una infección asintomática en los menores de tres meses hasta una diarrea grave por deshidratación, que puede ocasionar la muerte prematura de los niños aumentando la mortalidad y morbilidad del país. De los datos disponibles en la región de las Américas, el rotavirus causa aproximadamente 75,000 hospitalizaciones y cerca de 15.000 muertes anuales. Actualmente, aproximadamente el 6% de las muertes de los niños ecuatorianos menores de 5 años, es por causa de la diarrea aguda, y de éstos el 41% de los niños que se hospitalizan por diarrea son provocadas por rotavirus. (Burgos Pazmin & Villacis Yopez, 2012)

Es por todas estas razones que a partir de 2007 el Ministerio de Salud Pública del Ecuador implementó el “Protocolo para la Vigilancia Epidemiológica Centinela de Diarreas Causadas por Rotavirus y de la Invaginación Intestinal” en las provincias de Pichincha, Guayas, Morona Santiago, Manabí y Azuay con el fin de obtener información epidemiológica y de control y prevención. (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2007)

De acuerdo a todos los datos antes mencionados, en esta investigación se toma como hipótesis que, de todos los patógenos causantes de enfermedad diarreica aguda, el rotavirus es el agente vírico que más afecta a la población infantil entre los dos meses y cuatro años once meses de edad.

La información obtenida acerca de esta hipótesis sobre las infecciones por rotavirus, ayudará a prevenir o a elaborar sugerencias para mejorar el plan de vacunación de rotavirus, que le costó al país más de US\$5 millones, con la finalidad de evitar más de 1,000 muertes anuales por cuadros diarreicos a causa del rotavirus, casi 53,000 hospitalizaciones, alrededor de 60,000 consultas externas y 147,500 episodios de diarreas en casa. (Burgos Pazmin & Villacis Yopez, 2012)

En cuanto al procedimiento técnico por el que van a pasar las muestras, todos los análisis van a ser realizados de acuerdo a las técnicas e insertos de cada método y al pedido del médico quien, basándose en la clínica del paciente y sospecha médica, envía los exámenes requeridos al laboratorio.

El coproparasitario es un examen fácil y rápido que evalúa tanto las características microscópicas como macroscópicas de las muestras fecales, tomando en cuenta que es indispensable la experiencia del analizador para diferenciar la presencia de alteraciones normales, de las patológicas, como es encontrar parásitos intestinales, hifas, levaduras, células inflamatorias y eritrocitos que pueden estar presentes como consecuencia de la alteración de la normalidad en el tracto intestinal.

En el examen coproparasitario, se busca principalmente identificar las diferentes formas evolutivas de entero parásitos, además se determina las características macroscópicas de las heces como color, consistencia, moco y alteraciones visibles, como presencia de sangre evidente, restos mal digeridos y parásitos en varios estadios de su ciclo vital.

Dentro del examen microscópico la muestra se observa en un montaje en fresco con suero fisiológico y con solución de lugol. El suero fisiológico se usa en el caso de que en la muestra

hubiera parásitos en estado de trofozoito, ya que esta solución permite mantener aun viable al parásito, lo que va a permitir que se logre identificar correctamente el género y especie presente en la muestra, además permite observar los movimientos que pueden ayudar también en la identificación. En el montaje con lugol, tanto las estructuras normales como las patológicas se colorean de tal manera que resulta más fácil identificarlas. (Ministerio de Salud de la Nación Argentina, 2011)

Para la correcta identificación de enfermedad diarreica aguda causada por rotavirus, la técnica usada se basa en la reacción antígeno-anticuerpo determinada por la identificación del antígeno viral VP6 del grupo A de rotavirus. Esta prueba inmunocromatográfica permite una fácil y rápida identificación del virus, además de que tiene un 98% de sensibilidad y 97% de precisión. (Operon, 2012)

La identificación de polimorfonucleares en heces ayuda a determinar la presencia de procesos infecciosos bacterianos o de enfermedades inflamatorias intestinales. Este análisis sirve como guía tanto para el diagnóstico y tratamiento ya que evidencia el nivel de la inflamación intestinal. Esta prueba es simple y de bajo costo, puesto que solamente requiere de una coloración con Wright. (Ministerio de Salud de la Nación Argentina, 2011)

Otro análisis importante que se realiza en las heces fecales, es la identificación de sangre oculta. En el caso de los síndromes diarreicos, se realiza cuando se sospecha que, por la frecuencia de las deposiciones, ha ocurrido algún tipo de alteración que produce sangrado poco evidente o cuando se cree que la enfermedad diarreica aguda está siendo producida por un patógeno capaz de invadir la mucosa intestinal causando daños en los tejidos, produciendo la pérdida de sangre. Gracias a que la sangre presente en las heces tiene actividad de peroxidasa, la reacción con un indicador químico produce cambio de color. (Immunostics, Inc, 2012)

Se escogió el servicio de emergencia de la Novaclínica Santa Cecilia, ya que esta área recibe a todo tipo de pacientes tanto del área pública como privada, además está ubicada en un lugar

céntrico dentro de la ciudad de Quito y cuenta con todas las técnicas antes mencionadas en su servicio de laboratorio.

Este trabajo consta de cuatro capítulos principales: el primero que es la parte introductora donde se explica, en base a la información obtenida a nivel mundial y de país, sobre la realidad de la enfermedad diarreica aguda así como las bases que promovieron la realización de esta investigación.

El segundo capítulo tratara sobre la fisiología y fisiopatología de la enfermedad diarreica aguda, clasificación, generalidades, manifestaciones clínicas y los diferentes factores de nuestro país que pueden llevar a la aparición de esta enfermedad.

El tercer capítulo se enfoca en el diagnóstico de laboratorio, esta parte constará de tres subcapítulos importantes que abarcaran la etapa pre analítica, analítica y pos analítica.

En la etapa preanalítica de la materia fecal se analizará cómo se debe tomar la muestra, condiciones en las que debe estar el paciente y los recipientes adecuados para la toma de la misma, al ser una población infantil, que en muchos de los casos no controla esfínteres, se hablará de cómo tomar la muestra de heces de una manera adecuada sin afectar las condiciones analíticas de las heces.

Dentro de la parte analítica se detallará todos los procesos por los cuales deben pasar las muestras, tanto macroscópicas como microscópicas, así también las técnicas usadas, fundamentos y alteraciones normales como anormales que pueden estar presentes. En esta etapa se hablará sobre los agentes patógenos causantes de enfermedad diarreica aguda, y sobre los diferentes estadios en los que puede estar presente en las heces fecales. En la etapa pos analítica es indispensable que se analice el correcto reporte de resultados y correlación clínica de los mismos.

El cuarto capítulo consta del análisis de los datos estadísticos e interpretación de resultados, es importante porque se evaluará la relación entre las variables y la importancia de las mismas en la presentación de la enfermedad diarreica aguda.

Finalmente se presentará las conclusiones y recomendaciones de acuerdo a toda la información y datos obtenidos de todo el estudio.

CAPÍTULO 2

La enfermedad diarreica aguda se debe principalmente a una infección en el tracto gastrointestinal, es decir, a una gastroenteritis que puede ser causada por patógenos bacterianos, víricos o parasitarios. Muchas de estas infecciones son vehiculadas por alimentos. Las manifestaciones más comunes son diarrea y vómitos, que pueden estar también asociadas a síntomas sistémicos como dolor abdominal y fiebre. El término gastroenteritis captura el grueso de los casos infecciosos de diarrea. El término trastornos diarreicos se utiliza más comúnmente para denotar diarrea infecciosa en el ámbito de la salud pública. (Peralta Moreno, 2012)

2.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA DIARREA EN LA INFANCIA

La Organización Mundial de la Salud (OMS) sospecha que hay más de 700 millones de episodios de diarrea anualmente en niños menores de 5 años de edad en los países en desarrollo. Aunque la mortalidad global puede estar disminuyendo, la incidencia global de la diarrea sigue sin cambios en aproximadamente 3,2 episodios por niño/año. (Kliegman, Jenson, Stanton, & Behrman, 2010)

En Estados Unidos, hay aproximadamente 1.5 millones de visitas ambulatorias por gastroenteritis, 200.000 hospitalizaciones y 300 muertes al año. Por ejemplo en el caso de las infecciones por rotavirus, que es la causa vírica identificable más común que provoca gastroenteritis en todos los niños, provoca al menos el 35% de los episodios de diarrea acuosa graves y potencialmente mortales, con una estimación de 500.000 muertes por año en todo el mundo debidas a infecciones por rotavirus. (Kliegman, Jenson, Stanton, & Behrman, 2010)

Actualmente es evidente una disminución de la mortalidad por diarrea, a pesar de la ausencia de cambios significativos en la incidencia, gracias a una mejora en el tratamiento de los casos, así como de una mejor nutrición de los lactantes y niños. Dentro de las medidas tomadas se incluye el tratamiento de rehidratación oral generalizado en el domicilio y en el hospital, así como un mejor tratamiento nutricional de los niños con diarrea. Las enfermedades diarreicas pueden tener un impacto significativo sobre el desarrollo psicomotor y cognitivo en los niños, sobretodo en casos de diarrea y malnutrición persistente o prolongada. Los episodios tempranos y repetidos de diarrea en la infancia durante los períodos del desarrollo crítico, pueden ser aún más graves si se acompañan de malnutrición, coinfecciones y anemia. (Asociación Española de Pediatría, 2012)

2.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DIARREICA AGUDA

Se denomina diarrea al aumento de la frecuencia con disminución de la consistencia en las deposiciones junto con la pérdida excesiva de líquidos y electrolitos a través de las heces. En un lactante menor, que va desde los 29 días de nacido hasta el año de edad, presenta una eliminación de alrededor de 5gr/kg de heces. El intestino delgado absorbe la mayoría de agua; el colon concentra el contenido intestinal frente a un elevado gradiente osmótico, por lo tanto los trastornos que interfieren con la absorción del intestino delgado suelen producir una diarrea voluminosa, mientras que los que comprometen el colon producen una diarrea de menor volumen. La diarrea aguda puede estar asociada con otros síntomas y signos sugestivos de compromiso entérico como náuseas, vómito, dolor abdominal y fiebre.

(Kliegman, Jenson, Stanton, & Behrman, 2010)

La diarrea se produce como resultado de un trastorno en el transporte de solutos a través de la pared intestinal; el movimiento del agua a través de las membranas intestinales es pasivo y está determinado por los flujos activos y pasivos de los solutos, sobre todo del sodio, el cloro y la glucosa. La patogenia de la mayor parte de los episodios de diarrea se puede explicar mediante alteraciones secretoras, osmóticas, inflamatorias o de motilidad, aunque puede haber

casos donde se dé una combinación de estos mecanismos. (Kliegman, Jenson, Stanton, & Behrman, 2010)

La mayoría de las condiciones que originan diarrea está relacionada a alteraciones del líquido intestinal y del transporte de electrolitos. El aumento del contenido líquido de las heces puede producirse por disminución de su absorción o incremento de su secreción en el intestino delgado o en el colon. La absorción puede reducirse como resultado de la incapacidad del intestino para reabsorber solutos osmóticamente activos, ausencia de contacto entre la superficie absorptiva intestinal y el contenido luminal o por inhibición del transporte activo de electrolitos en la pared del intestino. (Argente & E., 2013)

La secreción aumentada de líquido puede producirse por un mecanismo pasivo o activo. En el primero existe un aumento de la presión hidrostática tisular que origina exudación paracelular hídrica. La secreción activa se puede dar como resultado de agentes que activan el AMP cíclico, de superficies aberrantes secretoras o como consecuencia de una lesión de la mucosa secretora que origina un exudado inflamatorio. (Argente & E., 2013)

La diarrea se puede clasificar por su duración en aguda y crónica. La diarrea es considerada aguda cuando su duración es menor de dos semanas y el paciente no ha referido síntomas similares. Diarrea crónica es aquella que dura más de cuatro semanas y su mecanismo fisiopatológico puede ser motor o secretor, aunque existen casos especiales donde puede haber combinación de estos mecanismos, en estos caso su etiología se basa en alteraciones funcionales, genéticas o anatómicas del sistema digestivo que causan diarreas persistentes. (Argente & E., 2013)

La causa más frecuente de diarrea aguda es la acción de agentes infecciosos que se adquieren por ingestión de comidas o bebidas contaminadas. El modo de contagio es fecal-oral. El agua, la leche, el pollo, los huevos o pescado suelen ser fuentes de infección. Puede también darse mediante transmisión de persona a persona por contaminación de las manos. En ciertos casos la diarrea puede producirse por antibióticos que alteran la microflora intestinal originando la producción de gérmenes que producen diarrea. (Guyton & Hall, 2011)

En el caso de que la diarrea se deba a un agente patógeno que produce gastroenteritis, esta infección en su mayoría se adquiere por vía feco-oral o por ingestión de alimentos o agua contaminados. La patogenia y la gravedad de la enfermedad bacteriana dependen de si los organismos tienen toxinas preformadas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*), producen toxinas o son invasivos y si se replican en el alimento. Los entero patógenos pueden llevar a una respuesta inflamatoria o no inflamatoria en la mucosa intestinal. (Kliegman, Jenson, Stanton, & Behrman, 2010)

Los entero patógenos provocan una diarrea no inflamatoria por la producción de entero toxinas por algunas bacterias, destrucción de las células de las vellosidades (superficie) por virus, adherencia por parásitos y adherencia y/o translocación por bacterias, mientras que la diarrea inflamatoria suele estar causada por bacterias que directamente invaden el intestino o producen citotoxinas, con la consiguiente entrada de líquidos, proteínas y células (hematíes, leucocitos) en la luz intestinal. Algunos enteropatógenos poseen más de una propiedad de virulencia. Algunos virus, como los rotavirus, seleccionan como objetivo las puntas de las microvellosidades de los enterocitos y pueden penetrar en las células por invasión directa o por endocitosis dependiente del calcio. Esto puede dar lugar a un acortamiento de la vellosidad y a la pérdida de la superficie absorptiva del enterocito (Kliegman, Jenson, Stanton, & Behrman, 2010)

La mayoría de los patógenos bacterianos elaboran entero toxinas; la proteína NSP4 del rotavirus actúa como entero toxina vírica. Las entero toxinas bacterianas pueden activar selectivamente la transducción de señales intracelulares del enterocito y pueden afectar también a las redistribuciones citoesqueléticas, con posteriores alteraciones en los flujos de agua y electrólitos a través de los enterocitos. El aumento por regulación de estas vías da lugar a la inhibición del transporte acoplado al NaCl y a un aumento de la salida de cloruro, lo que da lugar, a su vez, a una secreción neta y pérdida de agua a la luz intestinal. El transporte acoplado de sodio a glucosa y aminoácidos no se ve afectado en gran medida. La vía del óxido nítrico puede estar también implicada, ya que la producción endógena de óxido nítrico es significativamente mayor en la diarrea infecciosa que en la no infecciosa. (Kliegman, Jenson, Stanton, & Behrman, 2010)

Por ejemplo, *E. coli enterotoxigénica* (ETEC) coloniza y se adhiere a los enterocitos del intestino delgado por las fimbrias de su superficie (pili) e induce la hipersecreción de líquidos y electrólitos al intestino delgado por una de estas dos toxinas: la enterotoxina termolábil (LT) o la enterotoxina termoestable. La LT es estructuralmente similar a la toxina de *Vibrio cholerae* y activa la adenilato ciclasa, dando lugar a un aumento del guanosina monofosfato cíclico intracelular (GMPc) produciendo diarrea secretora caracterizada por gran volumen de agua en cada deposición, en contraste, las especies de *Shigella spp.*, causan gastroenteritis por una invasión superficial de la mucosa del colon, que invaden a través de las células M localizadas sobre las placas de Peyer. Después de la fagocitosis se producen una serie de acontecimientos, incluida la apoptosis de macrófagos, multiplicación y diseminación de bacterias al interior de células adyacentes, liberación de mediadores inflamatorios (interleucina IL-1 e IL-8), trasmigración de neutrófilos a la luz del colon, necrosis y degranulación de neutrófilos, una mayor rotura de la barrera epitelial y destrucción de la mucosa. (Kliegman, Jenson, Stanton, & Behrman, 2010)

Los enteropatógenos que son infecciosos en un pequeño inóculo (*Shigella spp.*, *Escherichia coli*, norovirus, rotavirus, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*) pueden ser transmitidos por contacto de persona a persona, mientras que otros, como el cólera son generalmente consecuencia de la contaminación del alimento o del abastecimiento de aguas. (OMS, 2013)

2.3. MECANISMOS DE ACCIÓN

Cuando un germen patógeno ingresa al organismo, debe evitar los mecanismos de defensa del huésped para poder actuar, como la acidez gástrica, motilidad del intestino delgado, formación de anticuerpos y microflora colónica; en el caso de que estos agentes externos logren pasar las

barreras de defensa pueden causar enfermedad por diferentes mecanismos, en este caso pueden intervenir distintos agentes como: bacterias, virus, parásitos y hongos.

La diarrea aguda es secundaria a la afectación intestinal que resulta de la interacción entre el agente infeccioso y la mucosa intestinal. En ciertos casos ocurre la penetración de la barrera mucosa por agentes extraños, que pueden tener toxinas.

Las toxinas microbianas pueden ligarse a los receptores del enterocito y estimular la secreción epitelial de agua e iones. Por otro lado, los microorganismos pueden dañar el enterocito produciendo una disminución en la absorción de electrolitos, una pérdida de las hidrolasas del borde de cepillo y un escape de fluido a través del epitelio. Al mismo tiempo también se puede producir lesión vellositaria en infecciones aguda por protozoarios como *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*. (Asociación Española de Pediatría, 2012)

Los mecanismos fisiopatológicos de la diarrea aguda inducida por rotavirus son múltiples. Los rotavirus tienen la capacidad de adherirse al revestimiento epitelial del tracto gastrointestinal y el principal sitio de replicación son los enterocitos sobre las vellosidades del intestino delgado. En el momento en el que se produce la infección se desarrolla un metabolismo alterado de las disacaridasas que se da como resultado de la destrucción selectiva de las puntas de las vellosidades intestinales y de otras proteínas de membrana del enterocito, que produce una diarrea osmótica y malabsortiva, con la disminución de la absorción de sales, agua y carbohidrato. (Asociación Colombiana de Pediatría, 2010)

El daño de estas vellosidades es reversible, pero la diarrea continúa hasta que las vellosidades se han regenerado, de tal manera que la severidad de la lesión va a determinar la duración de todos los síntomas. Sumado a esto se activa el sistema nervioso entérico con secreción de fluidos, produciendo diarrea secretora. Además el rotavirus presenta una proteína no estructural, NSP4, que tiene actividad de enterotoxina que causa elevados niveles de calcio intracelular, desestabilización de membrana, disrupción del citoesqueleto y muerte celular. (Asociación Colombiana de Pediatría, 2010)

Las enterotoxinas presentes en microorganismo como *Vibrio cholerae*, *E. coli enterotoxigénica*, *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus*, se encuentran en la comida

ingerida y actúan en el intestino delgado generando cambios en la absorción de electrolitos y un movimiento de líquidos hacia la luz intestinal. Las neurotoxinas, que también pueden estar presentes ya formadas en la comida, actúan sobre el sistema nervioso autónomo produciendo aumento del peristaltismo intestinal y tienen acción central que es acompañado por vómitos, este es el caso de *Staphylococcus aureus*. (Argente & E., 2013)

Las citotoxinas que invaden la mucosa intestinal producen daño directo en la misma, se forman dentro del cuerpo y actúan a nivel del colon, dentro de este grupo se encuentran microorganismos como *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.*, y *Clostridium difficile*. Existen ciertos microorganismos capaces de producir diarrea por enteroadherencia sin invadir la mucosa, entre estos están *E. coli enteroadherente*, *Criptosporidium spp.*, y *Giardia lamblia*. (Argente & E., 2013)

La diarrea inducida por *E. coli* es común y hay distintos tipos que se asocian con la enfermedad. *E. coli enterotoxigénica*, que actúa sobre el intestino delgado, el principal síndrome que se desarrolla es el de diarrea acuosa, sin fiebre y que se autolimita en 1 a 4 días. *E. coli enteroinvasiva* produce lesión colónica y se presenta como un síndrome disentérico: diarrea con muchas deposiciones poco abundantes y sanguinolentas, pujos tenesmo, fiebre y dolor abdominal. El examen de materia fecal muestra leucocitos, hematíes abundantes y pus. El cuadro clínico es indistinguible del producido por *Shigella spp.*

E. coli enterohemorrágica causa síndrome diarreico caracterizado por hematoquecia, pujos, tenesmo y fiebre en un tercio de los pacientes. En el examen de heces no se observan leucocitos. La *E. coli enteropatógena* actúa por adherencia a la mucosa del intestino delgado y origina diarrea de color marrón sin fiebre, que se autolimita. (Argente & E., 2013)

En el caso de los parásitos intestinales la mayoría de ellos no causan síndromes diarreicos agudos, pero en el caso de una infección por *Entamoeba histolytica*, al invadir el intestino grueso se puede comportar como un comensal inofensivo o bien invadir la mucosa intestinal y causar destrucción tisular. En casos especiales esta ameba puede invadir el hígado, los pulmones, el cerebro y la piel. (Olivos, Saavedra, Nequiz, & Perez, 2011)

El ciclo biológico de *Entamoeba histolytica* empieza cuando se ingiere agua o alimentos contaminados con quistes del parásito, al llegar al intestino delgado comienzan con algunas transformaciones que los convierten en trofozoitos. Cuando llegan al intestino delgado, los trofozoitos proliferan y otros se vuelven a enquistar. Por último al salir las heces, los quistes están listos para reiniciar su ciclo biológico nuevamente. (Olivos, Saavedra, Nequiz, & Perez, 2011)

La enfermedad causada por este parásito se caracteriza por la destrucción tisular en el intestino grueso y en los análisis microscópicos se observa infiltrado inflamatorio aunque en ciertos casos se puede observar que no existe daño celular. El paciente presenta un cuadro clínico de diarrea líquida que puede estar acompañada de moco, fiebre, sudoración excesiva, cefalea, cansancio, pérdida de apetito, náuseas, vómito, etc. El diagnóstico diferencial de este síndrome diarreico agudo se basa especialmente en la clínica del paciente y en la identificación del parásito en heces. (Olivos, Saavedra, Nequiz, & Perez, 2011)

En el ser humano existen algunas especies de amebas que pueden vivir en el sistema intestinal como: *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba coli*, *Iodoameba butschilli*, *Dientamoeba fragilis*, *Endolimax nana*, *Entamoeba dispar* etc., de las cuales solo *Entamoeba histolytica* es capaz de causar lesiones en el intestino o en alguno otro órgano. (Olivos, Saavedra, Nequiz, & Perez, 2011)

En general, sin importar el agente etiológico causante de diarrea aguda, la pérdida cuantiosa de agua y electrolitos a través de las heces puede derivar en un cuadro de deshidratación, siendo más grave en un niño pequeño por tener una mayor área de superficie corporal en relación con el peso del adulto y por lo tanto mayores pérdidas insensibles. (Asociación Española de Pediatría, 2012)

En edades tempranas también hay un mayor riesgo nutricional, por una gran respuesta catabólica en consecuencia a la infección y una disminución de las reservas nutricionales más rápidas que en el adulto. Otros factores importantes que producen afectación nutricional son la disminución de ingesta calórica, por la hiporexia concomitante y la restricción alimenticia

habitualmente indicada y la posible malabsorción intestinal de nutrientes como resultado de la lesión intestinal producido por el agente patógeno. (Asociación Española de Pediatría, 2012)

2.4. FACTORES DE RIESGO PARA LA GASTROENTERITIS

Los factores de riesgo incluyen la contaminación y un aumento de la exposición a enteropatógenos. Otros factores importantes son edad joven, inmunodeficiencia, sarampión, malnutrición y ausencia de alimentación a pecho exclusiva o predominante. La malnutrición aumenta el riesgo de diarrea y de mortalidad asociada. (Peralta Moreno, 2012)

Los riesgos son particularmente mayores con la malnutrición en micronutrientes. En niños con deficiencia de vitamina A, el riesgo de fallecer por diarrea, sarampión y malaria aumenta en un 20-24%. La deficiencia en zinc aumenta el riesgo de mortalidad por diarrea, neumonía y malaria en un 13-21%. (Kliegman, Jenson, Stanton, & Behrman, 2010)

En los países desarrollados, donde hay las cuatro estaciones, pueden producirse episodios de diarrea infecciosa por exposición estacional a organismos como rotavirus o exposición a patógenos en los marcos de un contacto íntimo (p. ej., guarderías). Las gastroenteritis también se asocian con pobreza, ambiente higiénico deficiente y escasos índices de desarrollo. (Morocho Treles, 2012)

En el caso del rotavirus, al ser transmitido de persona a persona vía fecal-oral, el contagio se facilita ya que como la mayoría de los virus sin envoltura, este sobrevive en fómites por largos periodos de tiempo, siendo muy contagioso y además se necesita pocos viriones para inducir a la enfermedad. Una persona infectada empieza a arrojar virus en las heces, e incluso por la orofaringe, antes del inicio de los síntomas. Millones de partículas virales se excretan por gramo de materia fecal en niños infectados. (Asociación Colombiana de Pediatría, 2010)

Los humanos son los únicos hospederos y, como con otros virus respiratorios y entéricos, existe un comportamiento por temporadas, esto es evidente sobretodo en climas templados, donde los rotavirus son probablemente responsables del gran aumento de muertes por diarrea durante la época de invierno. En cambio en climas tropicales existe una tendencia mucho menos marcadas en los cambios de incidencia por temporada, aunque es más prevalente en los meses más fríos y secos. (Asociación Colombiana de Pedriatria, 2010)

CAPÍTULO 3

3.1. DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO

La enfermedad diarreica aguda, la mayoría de las veces es un proceso autolimitado en el que, en la mayor parte de los casos, sólo es necesaria una valoración del paciente mediante adecuada historia clínica, y una cuidadosa exploración física para establecer las indicaciones pertinentes. (Asociación Española de Pediatría, 2012)

La gravedad de la diarrea está vinculada al grado de deshidratación, por lo que es fundamental una valoración lo más exacta posible de ésta, para evitar un retraso en el tratamiento y para determinar las intervenciones necesarias dependiendo del agente causal, su mecanismo de acción y la gravedad de la diarrea junto con sus síntomas. (Díaz Jordán Bolívar, Yèpez Espinales, & Obando Freire, 2012)

Cuando un paciente presenta un síndrome diarreico agudo, además de la correcta historia clínica y examen físico, es indispensable que se realice al paciente exámenes complementarios que van a confirmar o no la hipótesis diagnóstica. En este caso junto con la clínica de la enfermedad diarreica aguda es fundamental la realización de exámenes en las heces fecales que ayuden a identificar el agente etiológico causante del episodio diarreico en el niño. (Peralta Moreno, 2012)

No hay datos de la historia clínica, la exploración física o de las investigaciones complementarias que permitan predecir la probable etiología bacteriana, vírica, parasitaria y por hongos. Existen algunos parámetros orientativos por ejemplo en la diarrea bacteriana,

como son fiebre alta, presencia de sangre en las heces, dolor abdominal o afectación neurológica. (Asociación Española de Pediatría, 2012)

Para la realización de los exámenes de laboratorio es imprescindible explicar a los padres del menor, o quien en ese momento esté a cargo del niño, cuales son las condiciones en las que debe ir el paciente y como debe tomarse la muestra de las heces fecales.

El conocimiento y la explicación adecuada de cómo se deben realizar los exámenes de laboratorio permitirá mejorar el análisis de las heces y obtener un resultado real, evitando la presencia de sustancias o agentes que alteren la muestra y puedan producir tanto resultados falsos positivos como falsos negativos. (ISSSTE - Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, 2011)

3.1.1. ETAPA PREANALÍTICA

Dentro de la etapa preanalítica se debe tener en cuenta muchos aspectos importantes, entre ellos están las condiciones en las que debe ir el paciente sobre todo en lo referente a la alimentación. En esta etapa es importante explicar a los padres del niño u acompañante, de acuerdo a los exámenes que se van a realizar en las heces, que puede comer o no el menor, ya que hay ciertos compuestos presentes en los alimentos que son capaces de alterar el resultado de los exámenes de laboratorio. (Inmunostics, Inc, 2012)

Es importante también explicar cuál es la manera correcta de tomar la muestra de heces fecales, debido a que dependiendo de la edad del paciente y las consistencia de las deposiciones resulta a veces bastante complicado la recolección, en el caso de ser un lactante menor que usa pañales o en un menor que ya controla esfínteres.

Para la recolección de las muestras fecales, no se debe olvidar las normas generales para la recolección de muestras clínicas, las muestras deben ser tomadas antes de la administración de antibióticos siempre que sea posible, debe ser tomada del lugar de infección, evitando contaminación de lugares adyacentes, dentro del periodo óptimo, referido tanto para el

microorganismo a investigar como al tipo de muestra, es decir aproximadamente dos horas a temperatura ambiente, la cantidad debe ser la suficiente para poder realizar los análisis necesarios, los materiales deben ser los adecuados y las muestras deben ser introducidas en envases apropiados y correctamente rotulados. (Centers for Disease Control and Prevention, 2014)

3.1.1.1. MATERIAL

Los materiales básicos a utilizar para la toma de muestra de heces fecales para el diagnóstico de enfermedad diarreica aguda se basa principalmente en un frasco estéril, de boca ancha, con capacidad 50 ml, de tapa rosca y cierre hermético, portaobjetos, cubreobjetos (18x18/ 22x22 mm), aplicadores o palillos, microscopio, solución salina al 0.85% y solución de lugol. La muestra deberá ser procesada máximo en dos horas. Es importante tomar en cuenta de que, en caso de no tener a la mano un frasco estéril para la recolección, se puede usar uno no estéril pero con condiciones específicas, no contendrá restos de jabones, desinfectantes o iones metálicos (ISSSTE - Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, 2011).

3.1.1.2. ALIMENTACIÓN

Los días previos a la toma de la muestra el paciente debe evitar ingerir medicamentos como antidiarreicos, antiácidos, medicamentos para intoxicaciones que contengan sales de bismuto, carbón vegetal o contrastes radiológicos con bario y no aplicarse supositorios o ingerir sustancias laxantes y alimentos que dejen muchos residuos: cereales, coles, ensaladas, frutas de cutícula resistente y granos de envoltura dura (lentejas, arvejas). Estas indicaciones solo se aplican en casos donde no exista un cuadro diarreico agudo, ya que por la urgencia del caso no

se puede seguir las indicaciones antes mencionadas. (ISSSTE - Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, 2011)

3.1.1.3. TOMA DE LA MUESTRA

Es necesario obtener una muestra de heces de todos los casos de enfermedad diarreica aguda (EDA), que son atendidos en las diferentes casas de salud, con el objetivo de contribuir a mejorar el proceso de diagnóstico y manejo específico. La muestra es preferible que sea recolectada antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano. (ISSSTE - Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, 2011)

En los niños que ya controlen los esfínteres, se debe asegurar que defecuen en un recipiente limpio, tomando la precaución de que la muestra no se mezcle con orina, en este caso se puede usar un orinal. En los niños menores de un año es posible estimular con un hisopo estéril el esfínter anal y esperar que se produzca la deposición en un pañal desechable, que se puede colocar al revés para que no se absorba la muestra, es decir se debe colocar la parte no absorbente en contacto con el paciente. (ISSSTE - Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, 2011)

Se debe poner en el recipiente para la recolección de las heces aproximadamente 5ml de la misma, después se debe tapar el frasco e identificarlo correctamente con su etiqueta correspondiente. Es importante no manchar el contenedor ya que frascos manchados por fuera comportan un posible riesgo al manipularlos. Introducir el frasco herméticamente cerrado en una bolsa de plástico y enviarlo al laboratorio. (ISSSTE - Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, 2011)

3.1.2. ETAPA ANALÍTICA

Así como la correcta obtención de la muestra es un prerrequisito fundamental para arribar a un diagnóstico adecuado, la etapa analítica es sumamente importante para una buena identificación etiológica ya que va a depender de la capacidad y experiencia del personal de laboratorio, la sensibilidad y especificidad de cada prueba y análisis, y de que la muestra haya cumplido lo mejor posible las condiciones pre analíticas tanto del paciente como en la toma de muestra.

3.1.2.1. COPROPARASITARIO

El estudio en el laboratorio de muestras fecales de origen humano permite obtener datos con los cuales se puede determinar la situación funcional del sistema digestivo y excretor, además se puede determinar infecciones intestinales causadas por bacterias, virus u hongos o parásitos. (Centers for Disease Control and Prevention, 2014)

El examen coproparasitario es el análisis principal que se realiza en la enfermedad diarreica aguda, al ser rápido y de bajo costo permite optimizar el tiempo mejorando las acciones terapéuticas a tomar cuando un niño presenta diarrea aguda. (Asociación Española de Pediatría, 2012)

Este examen se basa en la identificación microscópica en las heces fecales de elementos parásitos presentes en ellas. Es de suma importancia tomar en cuenta que un resultado positivo, con raras excepciones, siempre es indicador de la existencia de parasitismo en el paciente. Pero, por el contrario, un resultado analítico negativo no descarta la posibilidad de parasitismo, ya que puede ser un resultado falso negativo por diferentes causas. (Centers for Disease Control and Prevention, 2014)

Es importante tomar en cuenta que el examen coproparasitario tiene una baja sensibilidad y actualmente y desde algunos años se está usando el análisis de coproantígenos, el problema de estas pruebas es el difícil acceso en cierto casos a este tipo de análisis ya que algunas poseen un precio elevado o en los centros de atención pública y privada no cuentan con estos exámenes, además de que requieren mayor preparación del paciente para la toma de muestra y algunas veces la repetición del examen. (Asociación Española de Pediatría, 2009)

Entre las causas determinantes de falsos resultado negativos, existen algunas causadas por los propios métodos o técnicas operativas y otras que se deben a la propia biología de los parásitos.

CAUSAS DE ERROR EN EL EXAMEN COPROPARASITARIO

Un problema importante se basa principalmente en que muchas veces las muestras son inadecuadamente recogidas. El problema radica en que muchas formas parasitarias sobre las que se basa el diagnóstico, son extremadamente lábiles fuera del organismo huésped, esto provoca que cuando una muestra fecal es conservada de manera inadecuada, las formas parasitarias se afecten deformándose o destruyéndose, haciendo prácticamente imposible su observación microscópica. (ISSSTE - Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, 2011).

Otro error importante se da por la escasez de parásitos en la muestra. La sensibilidad de los métodos coprológicos es relativamente baja, de tal forma que, cuando el número de elementos parasitarios es bajo, la presencia de los mismos no puede ser detectada, es por eso la importancia de que en casos donde la sospecha de una parasitosis es elevada pero se obtiene un resultado negativo para parásitos se opta por pedirle al paciente que se realice un examen coproparasitario seriado o por concentración. (Centers for Disease Control and Prevention, 2014)

Además se debe conocer la biología del parásito, ya que en ciertos casos, los elementos parasitarios no son eliminados con las heces, o tienen ciclos especiales en los que parasitan o migran a otros órganos antes de llegar a intestino, en estos casos, se debe tener en cuenta que la identificación no se realiza en base al examen coproparasitario, como es el caso de *Enterobius vermicularis* ya que se puede tener resultados negativos. (Centers for Disease Control and Prevention, 2014)

EXAMEN COPROLÓGICO

EXAMEN MACROSCÓPICO

PROCEDIMIENTO

Las muestras fecales se analizan para detectar la presencia de protozoos y larvas o huevos de helmintos. En las heces, los protozoarios se presentan en forma de huevos y de larvas, aunque a veces también pueden presentarse como gusanos adultos enteros o en segmentos. En general, las taenias adultas y sus segmentos resultan fácilmente visibles a simple vista, pero los huevos, las larvas, trofozoitos y los quistes solo se los puede observar usando el microscopio. La observación de los parásitos exige la preparación y material adecuado. (Organización mundial de la salud, 1992)

El análisis macroscópico deberá prestar especial atención a los siguientes aspectos: consistencia, color de las heces, restos alimenticios, moco, sangre y presencia de parásitos. (Organización mundial de la salud, 1992)

Las heces pueden presentar una consistencia homogénea o heterogénea, y pueden aparecer elementos no fecales, además puede haber presencia de moco, lo que a su vez es indicativo de

una irritación compatible con afectaciones del sistema gastrointestinal, en el caso de observarse restos vegetales groseros no digeridos, también puede ser subjetivo de deficiencias digestivas independientemente o no, de la presencia de patógenos. Es muy importante observar si las heces presentan sangre y si esta se observa como melena o si es evidente su presencia junto a las heces. Este aspecto ayuda a determinar si existe un sangrado digestivo alto o bajo respectivamente. (Argente & E., 2013)

Dentro de las características de las heces, la consistencia que presentan las heces pueden ser, duras, pastosas, blanda, semilíquida o líquida, estas características son importantes porque en ciertos casos sirven como guía diagnóstica para entender la causa etiológica del síndrome diarreico agudo. Además es imprescindible que, dentro del análisis macroscópico se observe si la muestra presenta parásitos macroscópicamente, ya que en casos especiales se pueden ver gusanos adultos o proglótides de Taenias. (Argente & E., 2013)

Para observar el color se debe destapar cuidadosamente la caja que contiene la muestra, es preciso tomar en cuenta que, la mayoría de las veces, las muestras fecales van a tener un color café y sus tonalidades, aunque también pueden tener un color rojo, amarillo, etc. La importancia del color radica en que puede indicar la presencia de sangre en las heces en el caso del color rojo u otras patologías asociadas si se presentan heces acólicas. (Guyton & Hall, 2011)

En el reporte de resultados se debe anotar las características de las heces antes mencionadas, de negativo a +++++, cabe recalcar que esta valoración es subjetiva y va a depender de la experticia del analizador y su meticulosidad en la búsqueda de parásitos. (Organización mundial de la salud, 1992)

EXAMEN MICROSCÓPICO

PROCEDIMIENTO

- Rotular adecuadamente el portaobjetos con el nombre o código del paciente
- Colocar una gota de lugol y otra de solución salina en cada lado de la placa portaobjetos
- Con un palillo o aplicador tomar una muestra de heces que sea representativa de las mismas, picando en todas las porciones de la materia fecal.
- Mezclar la muestra junto con la solución salina y después con el lugol, teniendo la precaución de no mezclar ambas soluciones. (Ulloa, 2004)

REPORTE DE RESULTADOS

- Las células epiteliales, los eritrocitos y leucocitos se los debe contar observando en el lente de 40x, el reporte se hace de acuerdo al número promedio presente en cada campo.
- Si se observan restos alimenticios como grasas o almidones, o a su vez se identifican cristales se debe reportar de negativo a +++++, es importante identificar el tipo de cristales que se están observando.
- Al evaluar la flora intestinal se debe reportar como aumentada o disminuida.
- En el caso de observar levaduras, micelios o hifa, estas deben ser especificadas y reportadas de negativo a positivo +++++ (Ulloa, 2004)

EXAMEN COPROPARASITARIO

Se basa principalmente en preparaciones húmedas con las heces fecales coloreadas con solución de Lugol y no coloreadas con Solución Salina al 0.85%, con la finalidad de identificar elementos parásitos.

UTILIDAD DE LA SOLUCIÓN SALINA AL 0.85%

- Ayuda a mantener la motilidad de los trofozoitos de protozoarios y larvas de helmintos, es importante recalcar que la solución salina no es útil para la identificación de ciertas especies, debido a que su estructura interna no queda muy definida.
- En el caso de trofozoitos se los va a observar transparentes y refringentes, incluso algunas veces motiles.
- Los quistes van a tener una forma redonda y de contorno definido.
- Los huevos de helmintos en su mayoría presentan coloración propia pero las larvas van a observarse incoloras, móviles y refringentes. (Organización mundial de la salud, 1992)

UTILIDAD DE LA SOLUCIÓN DE LUGOL

- Esta solución colorea las características morfológicas de quistes, huevos y larvas de parásitos intestinales haciendo más notable las estructuras internas, además tiñe el glucógeno y los núcleos de los quistes, si existen. (Organización mundial de la salud, 1992)

MATERIALES:

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Aplicadores o palillos
- Microscopio

- Solución de lugol
- Solución salina al 0.85%. (Organización mundial de la salud, 1992)

PROCEDIMIENTO

- Rotular el portaobjetos con el código de la muestra o nombre del paciente
- Colocar una gota de solución salina en un lado del portaobjetos y una gota de solución de lugol en el otro extremo.
- Con el palillo o aplicador tomar un poco de muestra de heces fecales, picando en diferentes partes de la muestra.
- Mezclar una cantidad de heces junto con la solución salina y otra con la solución de lugol, tener la precaución de que las muestras no se mezclen.
- Colocar el cubreobjetos en cada una de las emulsiones. (Organización mundial de la salud, 1992)

ANÁLISIS MICROSCÓPICO

- Evaluar primero la solución salina buscando la presencia de elementos refringentes como larvas, huevos, quistes o trofozoitos
- Para una mejor búsqueda se debe observar primero en lente de 10x y reevaluar con 40x para mejor detalle e identificación
- La observación de la placa se debe hacer de manera sistemática, de manera que no se dejen campos sin observar
- Al examinar el preparado con solución de lugol se debe repetir el procedimiento.

IDENTIFICACIÓN DE PARÁSITOS.

- En esta etapa es importante el conocimiento de los diferentes patógenos intestinales, su ciclo vital y las formas y características en las que pueden estar presentes en las muestras fecales.

- En el caso de quistes o huevos se debe conocer su forma, tamaño, grosor de la pared y el contenido de las estructuras sobre todo en lo referente a número y tamaño de núcleos, presencia de vacuolas, disposición de la cromatina etc.
- Al identificar trofozoitos se debe tomar en cuenta su forma, tamaño, tipo movimiento, organelos de locomoción e igual las estructuras internas.
- Si se observan larvas de parásitos se debe identificar en el extremo anterior la cavidad bucal y esófago; y en el extremo posterior el primordio genital y forma de la cola, ya que las características de cada uno de ellos ayuda en la identificación de género y especie. (Ulloa, 2004)

REPORTE DE RESULTADOS

En el caso de no encontrar parásitos se debe reportar: **NEGATIVO PARA PARÁSITOS**, pero si están presentes se debe especificar el ciclo de vida en el que se encuentran, para protozoarios se debe reportar quistes o trofozoitos y para helmintos su forma de huevo o larvas. (Ulloa, 2004)

DETALLES IMPORTANTES

Durante la preparación de la muestra se debe tomar en cuenta ciertos aspectos importantes que pueden guiar sobre lo que se puede observar en el análisis microscópico. Por ejemplo cuando las heces presentan consistencia líquida, con una gran cantidad de moco y sangre, existe la probabilidad de que en ellas estén presentes parásitos en forma de trofozoito. Estas características imponen la necesidad de realizar el examen microscópico inmediatamente después de la emisión fecal ya que ambientes extremos o diferentes a 37° centígrados alteran la morfología del parásito haciendo más difícil la identificación, si es que la muestra no se la analiza en el tiempo adecuado. (Centers for Disease Control and Prevention, 2014)

Cuando las heces fecales se presentan con una consistencia blanda o pastosa es posible encontrar múltiples formas parasitarias: trofozoitos y quistes de protozoos, huevos y/o larvas de helmintos. (Organización mundial de la salud, 1992)

Es importante tomar en cuenta que durante la preparación de la suspensión, se debe colorar una gota tanto de lugol como de solución salina junto con una cantidad de heces que después de realizarse la solución, esta permita leer las letras de un papel que puede estar puesto bajo la placa portaobjetos. (Ulloa, 2004)

3.1.2.2. DETECCIÓN DE ROTAVIRUS EN HECES

Basándose solo en el cuadro clínico, es difícil distinguir la gastroenteritis por rotavirus de otras causas de gastroenteritis aguda. Los hallazgos sugestivos de una infección por ese virus, incluyen una enfermedad febril con emesis y diarrea líquida, especialmente en niños de seis meses hasta 24 meses de edad. También es sugestiva la presencia de deshidratación más severa. (Asociación Colombiana de Pedriatria, 2010)

La detección del antígeno viral en la materia fecal, usando ensayos inmunoabsorventes unidos a enzimas (ELISA), o por partículas de aglutinación en látex son los kits diagnósticos disponibles comercialmente. La aglutinación en látex es particularmente útil en áreas con recursos limitados, donde en muchos casos se debe usar técnicas confirmatorias para evaluar los resultados, debido a la sensibilidad limitada del examen. Exámenes antigénicos comerciales, principalmente, detectan las proteínas VP2 y VP6 y solo detectan rotavirus pertenecientes al grupo A. Para detectar el serotipo exacto de VP4 o VP6 se usa técnicas de ELISA. (Asociación Colombiana de Pedriatria, 2010)

En este estudio, la determinación de la presencia de rotavirus en las heces fecales se realizará con el Kit perteneciente a la casa OPERON S. A, llamado Simple Rotavirus o Stick Rotavirus.

La técnica de detección se basa en un ensayo inmunocromatográfico para la detección cualitativa in vitro de antígenos de Rotavirus en la materia fecal, mediante la utilización de anticuerpos monoclonales contra el antígeno VP6 del grupo A de rotavirus, conjugados a partículas de látex rojas y anticuerpos monoclonales específicos para rotavirus en la membrana. (Operon, 2012)

Para mayor información sobre la técnica empleada ver Anexo 1.

3.1.2.3. ANÁLISIS DE SANGRE OCULTA EN HECES

PRUEBA DE GUAYACO MODIFICADA

Muchas veces existe pérdida de sangre en el tracto intestinal muy poco evidente ya que al estar eliminando en mínimas cantidades no es posible evidenciar esta pérdida. Cuando la eliminación de sangre se realiza en partes superiores del sistema digestivo, la hemoglobina presente en los glóbulos pasa por diferentes procesos químicos hasta ser excretada junto con las heces. El ácido clorhídrico gástrico metaboliza la hemoglobina produciendo hematina la que a su vez sufre degradaciones sucesivas al pasar por el intestino debido a la acción de enzimas, bacterias etc. Cuando las heces fecales contienen una mayor cantidad de sangre de lo que se pierde normalmente (2 a 2.5ml), se debe realizar la identificación de sangre oculta de heces. La pérdida de sangre se puede deber a numerosos procesos patológicos como alteraciones gastrointestinales, cáncer colorectal, úlceras, pólipos, anemia y ciertos procesos parasitarios que pueden invadir la mucosa intestinal y causar patología. (Inmunostics, Inc, 2012)

El análisis de sangre oculta en heces, se basa en una prueba cualitativa, con un dispositivo que contiene una tira de papel impregnada con extracto de resina de guayaco, donde la muestra de heces fecales va a ser colocada, los grupos hem de la hemoglobina tienen actividad peroxidasa y catalizan la oxidación de ácido alfa-naftol sulfonico por el peróxido de hidrogeno presente en la solución de peróxido usada para la prueba. Cuando se ha producido la reacción se ve de color “azul-verdoso”, si no hay este cambio de color la prueba es negativa para sangre oculta. Se debe esperar aproximadamente de 30 a 0 segundos para ver la reacción. (Immunostics, Inc, 2012)

Para mayor información sobre la técnica utilizada en este estudio ver Anexo 2

3.1.2.4. INVESTIGACIÓN DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES

La realización de la investigación de leucocitos polimorfonucleares en heces fecales, se basa en detectar la presencia de procesos inflamatorios de la mucosa intestinal, como ocurre en ciertas patologías como colitis ulcerativa o en infecciones bacterianas o por parásitos que son capaces de invadir la mucosa intestinal como es el caso de *E. coli enteroinvasiva* o *Entamoeba histolytica*. (Kliegman, Jenson, Stanton, & Behrman, 2010)

Es importante tomar en cuenta que en la enfermedad diarreica aguda, causada por virus o toxinas bacterianas no suele encontrarse leucocitos en heces, por ejemplo en la diarrea aguda producida por *Vibrio cholerae* (Kliegman, Jenson, Stanton, & Behrman, 2010)

MUESTRA

- Se debe recolectar una muestra de heces fecales de la misma manera que para un examen coproparasitario

PROCEDIMIENTO

- Realizar un frotis delgado de heces fecales con un poco de muestra representativa de las mismas, se debe preferir las áreas donde haya moco.
- En el caso de que la muestra sea de consistencia dura, se puede optar por diluir un poco de muestra con solución salina al 0.85%.
- Dejar secar el frotis al aire
- Colorar el frotis con el colorante Wright y dejar actuar durante 3 minutos
- Anadir agua corriente y esperas tres minutos más.
- Lavar cuidadosamente la placa para evitar el desprendimiento del frotis coloreado,
- Dejar secar y observar con lente de 100x y aceite de inmersión. (Ulloa, 2004)

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

- Se debe realizar una observación sistemática de algunos campos hasta contar aproximadamente 100 células blancas.
- Durante el conteo de las 100 células se debe diferenciar las clases de células que se están observando: polimorfonucleares (neutrófilos), mononucleares (linfocitos y monocitos) y las otros (eosinófilos y basófilos). (Ulloa, 2004)

RESULTADO

- Se debe identificar los polimorfonucleares de acuerdo a sus características de tinción y morfológicas como es citoplasma rosado, de 3 a 5 núcleos segmentados de color morado.

- De acuerdo a la variedad de los leucocitos encontrados se debe reportar el porcentaje de cada uno de los linajes celulares.
- Un porcentaje elevado de polimorfonucleares se asocia con infección bacteriana, en cambio una mayor cantidad de mononucleares es indicativo de infección viral. (Ulloa, 2004)

3.1.3. ETAPA POSTANALÍTICA

La etapa posanalítica es indispensable para la realización de un buen examen de laboratorio, en esta fase se debe correlacionar todos los datos hallados en la muestra junto con lo que se va a reportar en el informe final

Dentro de la enfermedad diarreica aguda se debe interrelacionar tanto las características macroscópicas y microscópicas que presenta la muestra.

CAPÍTULO 4

4.1. RESULTADOS

Esta investigación se realizó usando un diseño descriptivo transversal en la Novaclínica Santa Cecilia, ubicada en la ciudad de Quito, en el periodo de mayo a diciembre del 2013, en el cual se buscó identificar los diferentes agentes etiológicos causantes de enfermedad diarreica aguda en niños menores de cinco años hasta dos meses de edad.

Las muestras fueron tomadas en la Novaclínica Santa Cecilia, en el área de emergencia, tomando aproximadamente 40 muestras mensuales usando como criterios de inclusión a los niños de dos meses a cinco años de edad y que presenten los síntomas de enfermedad diarreica aguda. Aquellos pacientes que no entraron en el estudio fueron los niños que no tenían la edad para estar en el mismo y que además no presentaban síntomas de enfermedad diarreica aguda, se usó un muestreo aleatorio simple tomando muestras al azar de los pacientes que acudan al servicio de emergencia.

Se calculó el tamaño muestral con la fórmula: $n = \frac{Z_{1-\alpha}^2 * p * q}{d^2}$ con un nivel de confianza del 95% y un error del 0,06, obteniendo como resultado una muestra de 267 niños menos de cinco años hasta dos meses de edad.

Después de obtener todos los datos, el análisis estadístico se realizó mediante el cálculo de medida de frecuencia para los diferentes agentes etiológicos causantes de enfermedad diarreica aguda y correlación entre las variables como edad, consistencia de las deposiciones, presencia de moco y determinación de sangre oculta.

4.2. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El análisis e interpretación de resultados se va a realizar de acuerdo a cada uno de los objetivos planteados dentro del estudio.

1. Relacionar las características de las heces con su causa etiológica

Tabla 1: Relación entre la consistencia de las deposiciones y rotavirus

		Consistencia de las deposiciones	
		Diarrea infecciosa	Diarrea no infecciosa
		Recuento	Recuento
Rotavirus	Negativo	26	214
	Positivo	8	19

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos de muestras fecales procesadas en el laboratorio clínico de Novaclínica Santa Cecilia, mayo – diciembre 2013

Tabla 2: Relación entre la consistencia de las deposiciones y parásitos

	Consistencia de las deposiciones	
	Diarrea infecciosa	Diarrea no infecciosa
	Recuento	Recuento
Parásitos Helmintos	0	0
Protozoarios	6	3
No se observa parásitos	28	230

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos de muestras fecales procesadas en el laboratorio clínico de Novaclínica Santa Cecilia, mayo – diciembre 2013

Tabla 3: Relación entre la consistencia de las deposiciones y polimorfonucleares

		Consistencia de las deposiciones	
		Diarrea infecciosa	Diarrea no infecciosa
		Recuento	Recuento
Polimorfonucleares	Negativo	4	205
	25%	1	5
	50%	7	8
	75%	8	10
	Mayor a 75%	14	5

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos de muestras fecales procesadas en el laboratorio clínico de Novaclínica Santa Cecilia, mayo – diciembre 2013

Tabla 4: Relación entre la consistencia de las deposiciones y mononucleares.

		Consistencia de las deposiciones	
		Diarrea infecciosa	Diarrea no infecciosa
		Recuento	Recuento
Mononucleares	Negativo	14	211
	25%	12	10
	50%	8	8
	75%	0	4
	Mayor al 75%	0	0

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos de muestras fecales procesadas en el laboratorio clínico de Novaclínica Santa Cecilia, mayo – diciembre 2013

2. Correlacionar el agente etiológico de EDA con los meses de edad de los niños.

Tabla 5: Presencia de polimorfonucleares de acuerdo a la edad de los pacientes

	Edad de los pacientes				
	0-12 Meses	13 - 24 meses	25 - 36 meses	37 - 48 meses	49 - 60 meses
	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento
Polimorfonucleares Negativo	66	72	27	19	25
25%	2	3	1	0	0
50%	4	5	2	2	2
75%	5	7	3	2	1
Mayor a 75%	7	2	2	6	2

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos de muestras fecales procesadas en el laboratorio clínico de Novaclínica Santa Cecilia, mayo – diciembre 2013

Tabla 6: Presencia de mononucleares de acuerdo a la edad de los pacientes.

	Edad de los pacientes				
	0-12 meses	13 - 24 meses	25 - 36 meses	37 - 48 meses	49 - 60 meses
	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento
Mononucleares Negativo	72	75	29	23	26
25%	7	6	3	4	2
50%	4	6	2	2	2
75%	1	2	1	0	0
Mayor al 75%	0	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos de muestras fecales procesadas en el laboratorio clínico de Novaclínica Santa Cecilia, mayo – diciembre 2013

Tabla 7: Presencia de parásitos intestinales de acuerdo a la edad de los pacientes

	Edad de los pacientes				
	0-12 meses	13 - 24 meses	25 - 36 meses	37 - 48 meses	49 - 60 meses
	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento
Parásitos Helmintos	0	0	0	0	0
Protozoarios	1	3	0	2	3
No se observan parásitos	83	86	35	27	27

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos de muestras fecales procesadas en el laboratorio clínico de Novaclínica Santa Cecilia, mayo – diciembre 2013

Tabla 8: Presencia de rotavirus de acuerdo a la edad de los pacientes

	Edad de los pacientes				
	0-12 meses	13 – 24 meses	25 – 36 meses	37 - 48 meses	49 - 60 meses
	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento
Rotavirus Negativo	74	82	32	26	26
Positivo	10	7	3	3	4

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos de muestras fecales procesadas en el laboratorio clínico de Novaclínica Santa Cecilia, mayo – diciembre 2013

3. Establecer la presencia de polimorfonucleares y mononucleares de acuerdo a la causa de la diarrea aguda.

Tabla 9: Relación de la presencia de polimorfonucleares con rotavirus.

	Polimorfonucleares				
	Negativo	25%	50%	75%	Mayor a 75%
	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento
Rotavirus Negativo	194	5	12	15	14
Positivo	15	1	3	3	5

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos de muestras fecales procesadas en el laboratorio clínico de Novaclínica Santa Cecilia, mayo – diciembre 2013

Tabla 10: Relación de la presencia de polimorfonucleares con parásitos intestinales

	Polimorfonucleares				
	Negativo	25%	50%	75%	Mayor a 75%
	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento
Parásitos Helmintos	0	0	0	0	0
Protozoarios	3	0	3	1	2
No se observa parásitos	206	6	12	17	17

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos de muestras fecales procesadas en el laboratorio clínico de Novaclínica Santa Cecilia, mayo – diciembre 2013

Tabla 11: Relación de la presencia de mononucleares con rotavirus

	Mononucleares				
	Negativo	25%	50%	75%	Mayor al 75%
	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento
Rotavirus Negativo	207	17	12	4	0
Positivo	18	5	4	0	0

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos de muestras fecales procesadas en el laboratorio clínico de Novaclínica Santa Cecilia, mayo – diciembre 2013

Tabla 12: Relación de la presencia de mononucleares con parásitos intestinales.

	Mononucleares				
	Negativo	25%	50%	75%	Mayor al 75%
	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento
Parásitos Helmintos	0	0	0	0	0
Protozoarios	4	2	3	0	0
No se observa parásitos	221	20	13	4	0

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos de muestras fecales procesadas en el laboratorio clínico de Novaclínica Santa Cecilia, mayo – diciembre 2013

4. Determinar la presencia de sangre oculta conforme al patógeno presente

Tabla 13: Relación entre la presencia de sangre oculta y polimorfonucleares.

	Sangre oculta			
	Negativo	+	++	+++
	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento
Polimorfonucleares Negativo	186	18	4	1
25%	4	1	0	1
50%	8	6	1	0
75%	9	6	1	2
Mayor a 75%	4	8	4	3

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos de muestras fecales procesadas en el laboratorio clínico de Novaclínica Santa Cecilia, mayo – diciembre 2013

Tabla 14: Relación entre la presencia de sangre oculta y mononucleares.

	Sangre oculta			
	Negativo	+	++	+++
	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento
Mononucleares Negativo	189	26	7	3
25%	10	7	2	3
50%	8	6	1	1
75%	4	0	0	0
Mayor al 75%	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos de muestras fecales procesadas en el laboratorio clínico de Novaclínica Santa Cecilia, mayo – diciembre 2013

Tabla 15: Relación entre la presencia de sangre oculta y parásitos.

	Sangre oculta			
	Negativo	+	++	+++
	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento
Parásitos Helmintos	0	0	0	0
Protozoarios	3	4	2	0
No se observa parásitos	208	35	8	7

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos de muestras fecales procesadas en el laboratorio clínico de Novaclínica Santa Cecilia, mayo – diciembre 2013

Tabla 16: Relación entre la presencia de sangre oculta y rotavirus.

	Sangre oculta			
	Negativo	+	++	+++
	Recuento	Recuento	Recuento	Recuento
Rotavirus Negativo	195	35	5	5
Positivo	16	4	5	2

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos de muestras fecales procesadas en el laboratorio clínico de Novaclínica Santa Cecilia, mayo – diciembre 2013

4.3. DISCUSIÓN

- En el estudio se analizaron 267 muestras de heces de fecales de niños de 5 años hasta dos meses de edad, de las cuales 73 tuvieron presencia ya sea de células indicadoras de inflamación como son los polimorfonucleares, parásitos intestinales o dieron positivo para rotavirus.
- En lo que respecta a la presencia de leucocitos en las heces fecales, no se puede concluir cual es la causa precisa de su aparición ya que son células indicativas de inflamación intestinal y no revelan el agente etiológico de la enfermedad diarreica aguda.
- Una de las limitaciones que presentó el estudio es que no se realizó coprocultivo, coproparasitario seriado, ni la determinación de coproantígenos en las muestras que no tuvieron presencia de parásitos o no dieron positivo para rotavirus.
- De las 73 muestras positivas, el 50.68% corresponde a la presencia de polimorfonucleares superior al 75%, es decir que estos pacientes presentaron inflamación intestinal en el tiempo que presentaron el cuadro diarreico agudo. Al identificar leucocitos en las muestras fecales se debe realizar una identificación confirmatoria a través de coprocultivo.
- En las 37 muestras donde se encontró la presencia de polimorfonucleares clínicamente significativo, el 59.45% presentó una consistencia de diarrea infecciosa con 22 muestras que cumplían estas características y un 40.54% presentaron diarrea no infecciosa. Es decir la mayor parte de niños que presentan diarrea infecciosa van a tener polimorfonucleares mayores al 75%.
- De los niños con polimorfonucleares positivos, su mayoría se presentó en pacientes de hasta un año de edad seguidos por los niños menores de 24 meses, dando el 56.7% del total de pacientes que tuvieron polimorfonucleares mayores al 75% dentro de estos rangos de edad. En relación a esto se puede establecer que los niños de menor edad son los que tienen respuestas inflamatorias más fuertes al presentar cuadros diarreicos.
- El agente causal más común de enfermedad diarreica aguda de acuerdo a los datos obtenidos se debe a rotavirus, obteniéndose 27 muestras positivas de las 267 analizadas, es

decir de todas las muestras positivas en donde se encontró el agente causal 36.98% corresponden a rotavirus.

- Del total de muestras que dieron rotavirus positivos, 70.3% se presentaron como diarreas no infecciosas y el 29.6% como diarrea infecciosa. Los niños que presentaron más cuadros de gastroenteritis causada por rotavirus fueron los menores de 2 años, siendo más frecuente en menores de 1 año, es decir ocuparon el 62.9% de los casos. Tomando en cuenta toda esta información se puede deducir que los niños que aún están en periodo de lactancia presentan más cuadros de diarrea no infecciosa causada por rotavirus.
- En el caso de los parásitos, se encontró que de las 73 muestras positivas, los parásitos intestinales provocan aproximadamente el 12.32% de diarreas en menores de cinco años, siendo el agente menos frecuente causante de EDA. Para el análisis de parásitos intestinales, se tomaron dos grandes grupos como agentes causales, el primer grupo fueron helmintos y el segundo protozoarios. En ninguna de las muestras de heces fecales se encontró alguna forma de estadio de helmintos, lo que indica que es muy poco probable que en niños menores de cinco años los cuadros diarreicos puedan ser provocados por este grupo de parásitos, aunque puede depender de la población estudiada.
- Al contrario del primer grupo de enteroparásitos, los protozoarios sí estuvieron presentes en las muestras analizadas, correspondiendo a 9 muestras positivas para parásitos del total analizado, con presencia de quistes de *Entamoeba histolytica* en todos los casos. 6 de las muestras se mostraron como diarrea infecciosa y 3 como diarrea no infecciosa, de acuerdo a la información obtenida se podría decir que cuando hay presencia de quistes de *Entamoeba histolytica* se va a producir principalmente diarrea infecciosa en el 66.66% de los casos.
- La presencia de protozoarios fue más frecuentemente en niños de 2 años y 4 a 5 años, ninguna muestra en los niños menores de 12 meses tuvo presencia de quistes de *Entamoeba histolytica*.
- Dentro de los datos obtenidos, es interesante denotar que en ningún caso se evidenció presencia de mononucleares con valores clínicamente significativos, sin importar el tipo de diarrea, el agente etiológico causante o la presencia de sangre.

- La mayor parte de diarreas que se presentan en niños menores de 5 años hasta dos meses de edad son de tipo no infeccioso, presentándose 233 muestras con estas características de la 267 analizadas.

4.4. CONCLUSIONES

- El agente causal más frecuente de enfermedad diarreica aguda es el rotavirus con lo cual se comprueba la hipótesis propuesta en este estudio
- No se pudo determinar qué número de pacientes presento EDA de origen bacteriano en base a los análisis realizados en las heces fecales.
- Los niños que oscilan entre 1 a 2 años son quienes presentan más cuadros diarreicos de origen viral dentro del grupo total de pacientes estudiados.

4.5. RECOMENDACIONES

- En los casos donde no se encontró el agente etiológico se debe realizar el estudio con coprocultivo para documentar el agente etiológico de la diarrea, sobre todo en aquellos pacientes en los que hay una fuerte sospecha de que el agente causal es bacteriano;
- Al ser el rotavirus causante de enfermedad diarreica aguda, sería importante tipificar las cepas de rotavirus para buscar la más prevalente en nuestro medio;
- Se recomienda la investigación de otras especies de virus causantes de enfermedad diarreica aguda como es el adenovirus, en este caso se podría buscar con qué frecuencia este virus afecta a la población infantil y a que edades principalmente;
- Se recomienda ampliar el estudio a poblaciones de otros sectores, en donde los niños están expuestos a diferentes condiciones de vida que determinan su estado de salud, se podría incluir por ejemplo la población infantil en los hospitales públicos, centros de salud y zonas rurales, etc.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Argente, H. A., & E., A. M. (2013). *Semiología Médica- Enseñanza basada en el paciente*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Asociación Colombiana de Pedriatria. (2010). Enfermedad por rotavirus. Características epidemiológicas, clínicas, prevención y manejo. *Curso Continuo de Actualización en Pedriatria*, VI(2).
- Asociación Española de Pediatría. (2009). Giardiasis: Una breve revisión. Perspectivas diagnósticas en el laboratorio clínico. Valencia, España.
- Asociación Española de Pediatría. (2012). Diarrea aguda. *Protocolo diagnóstico terapéutico de Gastroenterología, Hepatología, Nutrición Pediátrica*. Madrid, España.
- Burgos Pazmin, P., & Villacis Yopez, J. (2012). *Incidencia de los factores que determinan la Enfermedad Diarreica Aguda por Rotavirus en la ciudad de Guayaquil*. Guayaquil.
- Cabezas Quinzo, M. P. (2011). *Intervención educativa sobre prevención de enfermedades diarreicas agudas*. Riobamba.
- Centers for Disease Control and Prevention. (13 de Septiembre de 2014). *Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern*. Obtenido de <http://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticProcedures/index.html>
- Díaz Jordán Bolívar, G. A., Yépez Espinales, V., & Obando Freire, F. (2012). Relación de U/P osmolar sobre parámetros clínicos de evolución de la enfermedad diarreica aguda en población pediátrica. Experiencia con 89 niños, hospital "Leon Becerra". Guayaquil, Guayas, Ecuador.
- El Banco Mundial. (2013). *Indicadores de desarrollo mundial*. Washington.
- Endemian. (2004). *ENCUESTA DEMOGRÁFICA Y DE SALUD MATERNA E INFANTIL*. Quito.
- Guyton, A., & Hall, J. (2011). *Fisiología médica de Guyton* (Decimosegunda edición ed.). Elsevier.
- Inmunostics, Inc. (2012). *Manual Instructivo Hema- screen*. Philadelphia.
- ISSSTE - Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado. (2011). *Instructivo para la toma y envío de muestras para diagnóstico de Enfermedad Diarreica Aguda*. México.
- Kliegman, R. M., Jenson, H., Stanton, B., & Behrman, R. E. (2010). *Nelson Tratado de Pediatría* (Decimotercera edición ed.). Washington: Elsevier.
- Medicine. (2010). *Enfermedades infecciosas: Parasitosis*. Elsevier.

- Ministerio de Salud de la Nación Argentina. (2011). *Plan de Abordaje Integral de la Enfermedad Diarreica Aguda*. Buenos Aires.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2007). *Protocolo para la Vigilancia Epidemiológica Centinela de Diarreas Causadas por Rotavirus y de la Invaginación Intestinal*". Quito: Imprenta Activa.
- Morocho Treles, V. C. (2012). Factores de riesgo asociados a enfermedad diarreica aguda en menores de 5 años atendidos en el centro "Hugo Gonzales" . Loja, Loja, Ecuador .
- Olivos, A., Saavedra, E., Nequiz, M., & Perez, R. (Marzo - Abril de 2011). Amebiasis: mecanismos moleculares de la patogenicidad de Entamoeba histolytica. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 54(2).
- OMS. (2013). *Organizacion Mundial de la Salud* . Recuperado el 18 de Junio de 2014, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>
- Operon. (Enero de 2012). Manual Simple Rotavirus . Madrir , España.
- OPS, A. y. (2008). *Tratamiento de la diarrea: Manual Clínico para los Servicios de Salud*". Washington, D.C.
- Organizacion Mundial de la Salud . (2012). *Estadísticas Sanitarias MUndiales 2012* . Ginebra .
- Organización mundial de la salud. (1992). *Metodos basicos de laboratorio en parasitologia medica*. Ginebra, Suiza. Obtenido de OMS.
- Organizacion Mundial de la Salud. (Abril de 2013). *Enfermedades diarreicas*.
- Peralta Moreno, J. C. (2012). Factores que inciden en la enfermedad diarreica aguda en niños/as menores de 5 años atendidos en el subcentro de salud El Aguador en el segundo trimestre del 2012. El Oro, Ecuador.
- Puruncajas, J. (Octubre de 2014). Identificación etiológica de la enfermedad diarreica aguda (EDA) en niños de dos meses a cinco años de edad en el servicio de emergencia de Novaclínica Santa Cecilia en el periodo de junio a diciembre del 2013. Quito , Pichincha, Ecuador .
- Salvatella, R., & Eirale, C. (1996). Examen coproparasitario. Metodología y empleo. Revisión técnico metodológica. *Revista Médica Uruguay*, 215-223.
- Toca, M. d. (2012). *Diarrea aguda y cronica*. Buenos Aires : Ideografica .
- Ulloa, L. (2004). *Manual de practicas de parasitlogía*. Quito, Pichincha, Ecuador.

ANEXOS

Anexo 1

STICK ROTAVIRUS /SIMPLE ROTAVIRUS

Test inmunocromatográfico en un sólo paso para la detección de rotavirus en heces

FINALIDAD PREVISTA

El inmunoensayo cromatográfico Simple Rotavirus o Stick Rotavirus es un procedimiento para la detección cualitativa in vitro de antígenos de Rotavirus en la materia fecal.

INTRODUCCIÓN

Los rotavirus son la principal causa de gastroenteritis agudas. Las gastroenteritis por virus entéricos pueden resultar mortales en poblaciones de riesgo como niños, ancianos o individuos inmunodeprimidos.

Su transmisión tiene lugar por vía oral-fecal, siendo el periodo de incubación entre 1 y 3 tres días. Síntomas característicos son vómitos, diarrea acuosa entre 3 y 8 días, fiebre y dolor abdominal. La inmunización tras la primera infección es incompleta pero infecciones posteriores tienden a ser menos severas que la inicial.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

El test Stick Rotavirus / Simple Rotavirus utiliza anticuerpos monoclonales contra el antígeno VP6 del grupo A de rotavirus, conjugados a partículas de látex rojas y anticuerpos monoclonales específicos para rotavirus en la membrana.

En este test la muestra es tratada primeramente con un diluyente de muestra para extraer los antígenos de rotavirus de las heces. Tras la extracción, sólo se necesita poner el extracto en el dispositivo de reacción. Cuando el extracto de la muestra fluye a través de la membrana del test, las partículas coloreadas migran. En el caso de un resultado positivo los anticuerpos específicos, presentes en la membrana, capturarán las partículas coloreadas.

Diferentes líneas de color serán visibles, dependiendo del contenido de virus en la muestra. Estas líneas se usan para interpretar el resultado, a los cinco minutos de incubación a temperatura ambiente.

MATERIALES INCLUIDOS EN EL KIT

1. Dispositivos de reacción (simples o sticks)

El número de dispositivos de reacción del kit se encuentra indicado en la etiqueta externa del kit tras el símbolo



2. Viales con el tampón de dilución

El volumen de tampón diluyente suministrado es proporcional al número de tiras incluidas y está indicado en la etiqueta del vial que lo contiene.

Indicación:

En el formato simple el número de viales suministrados debe ser igual al número de cassettes. (Ejemplo: kit de 20 unidades debe contener 20 cassettes + 20 viales) En el formato stick, se suministra el volumen total de tampón de dilución para todas las tiras en un solo vial.

PRECAUCIONES

1. Las muestras 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.
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 materia fecal adecuada: 30-50 mg de heces sólidas ó 100 ul de heces líquidas. Un exceso de muestra impide la cromatografía correcta cromatografía
14. En el caso del producto Stick envasado en tubo es importante que se vuelva a cerrar de manera inmediata una vez sacada la tira reactiva dado que

una humedad ambiental elevada 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. Su fecha de caducidad está impresa en la envoltura.

MUESTRAS

Se deben recoger las muestras fecales tan pronto como sea posible después del comienzo de los síntomas. A la semana de la aparición de los primeros síntomas el título de virus empieza a decrecer y por lo tanto pueden ser más difíciles de identificar.

Las muestras pueden guardarse en el refrigerador (4 °C aprox.) 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.

Prestar especial atención cuando se analicen muestras hemorrágicas pues suelen dar problemas de inespecificidad cuando el contenido en sangre es elevado.

PROCEDIMIENTO SIMPLE ROTAVIRUS

1. Importante: Tomar hez de al menos tres sitios diferentes de la muestra con el fin de obtener una muestra lo más representativa posible.
2. Desenroscar el tapón del vial con cuidado de no derramar el tampón de extracción. Con el extremo del aplicador tomar una cantidad suficiente de heces (30 –30 mg).50 mg Si las heces son líquidas coger con ayuda de una pipeta 100 microlitros y transferirlos al vial.
3. Introducir el aplicador con la muestra en el vial. Enroscar bien el tapón y agitar vigorosamente para asegurar una mezcla homogénea.
4. Sacar el dispositivo 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.
5. Romper el extremo superior del vial. Romper
6. Añadir 4 ó 5 gotas en la zona para la muestra del dispositivo de reacción (ventana circular señalada con una flecha). No añadir partículas sólidas con el líquido.
7. Esperar 5 minutos leer e interpretar el resultado. minutos,

PROCEDIMIENTO STICK ROTAVIRUS

1. Importante: Tomar hez de al menos tres sitios diferentes de la muestra con el fin de obtener una muestra lo más representativa posible.
2. Tomar un tubo de ensayo por muestra. Añadir aproximadamente 1 - 1,5 mL de tampón

3. 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.

4. Agitar vigorosamente para lograr una suspensión de la muestra en el diluyente (alternativamente, agitar en el Vortex durante 15 segundos).

5. 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 500 microlitros del sobrenadante a otro tubo de ensayo.

6. 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.

7. Introducir la tira reactiva en el segundo 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 más largo o reducir la cantidad de muestra.

8. 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

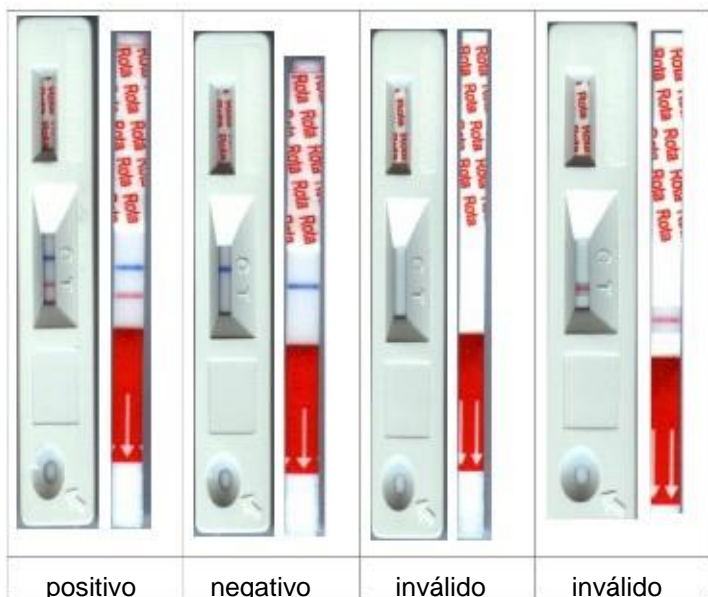
NEGATIVO:NEGATIVO: Sólo aparece una línea transversal AZUL en

la zona central de la tira de reacción. Siempre debe aparecer esta línea. (Simple alineada con la letra "C" (control) marcada en la carcasa.)

POSITIVO:POSITIVO: Además de la línea AZUL de control apa

otra línea ROJA/ROSA en la zona central de la tira de reacción. (Simple alineada con la letra "T" marcada en la carcasa) La intensidad de esta coloración va a ser variable según la concentración presente de antígeno. 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.

En el caso de las muestras con sangre, se aconseja el uso de una técnica alternativa pues el problema de la inestabilización no suele depender de la tira empleada sino de la propia matriz de la muestra.



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. Repita el test preparando la muestra en cantidad adecuada.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1.El test debe usarse sólo para la detección de antígenos de Rotavirus 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. Estas 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 otros virus o sustancias durante la evaluación del test. Un resultado negativo no excluye totalmente una posible infección por Rotavirus. 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.

7. Se ha observado que muestras fecales con un alto contenido en sangre interfieren negativamente con el test, pudiendo aparecer problemas de inespecificidad (falsos positivos) con muestras que son negativas para el analito reconocidos por la tira.

8.UMBRAL DE DETECCION

A partir de multitud de ensayos con diferentes observadores en diferentes condiciones y con lotes distintos se observa que el test detecta sin problemas 16 ng/mL de proteínas víricas a los 5 minutos.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

Se ha llevado a cabo un estudio comparativo del Stick Rotavirus frente a ELISA Ridascreen (de r-Biopharm, Darmstadt, Alemania). Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Rotavirus		101 muestras		OPERON	
				+	-
ELISA Ridascreen	+	11	90	14	87
	-			11	0
				3	87
				Sensibilidad >99,9%	
				Especificidad 96,6%	
				Valor predictivo positivo 78,6%	
				Valor predictivo negativo >99,9%	

REPETIBILIDAD

PRECISIÓN INTRAENSAYO

La precisión analizada con 10 ensayos a 8 concentraciones diferentes de antígeno posee una elevada repetitibilidad.

125	62	31	16	8	4	2	0
+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	±	-	-

**REPRODUCIBILIDAD
PRECISIÓN INTERDÍA**

Se ensayan 8 muestras de diferentes concentraciones durante 10 días obteniéndose una elevada reproducibilidad y concordancia en todos los días analizados.

Día	125	62	31	16	8	4	2	0
1	+	+	+	+	+	±	-±	- -
2	+	+	+	+	+	±	-±	- -
3	+	+	+	+	+	±	-±	- -
4	+	+	+	+	+	±	-±	- -
5	+	+	+	+	+	±	-±	- -
6	+	+	+	+	+	±	-±	- -
7	+	+	+	+	+	±	-±	- -
8	+	+	+	+	+	±	-±	- -
9	+	+	+	+	+	±	-±	- -
10	+	+	+	+	+	±	-±	- -

PRECISIÓN INTERLABORATORIO

Tres laboratorios-operadores distintos ensayan mismas muestras apreciando que el límite de sensibilidad de 16 ng/ml siempre es alcanzado.

las de

		125	62	31	16	8	4	2	1	0
1	Stk1	+	+	+	+	+	±	-±	- -	+
	Stk2	+	+	+	+	+	±	-±	- -	+
2	Stk1	+	+	+	+	+	±	-±	- -	+
	Stk2	+	+	+	+	+	±	-±	- -	+
3	Stk1	+	+	+	+	+	±	-±	- -	+
	Stk2	+	+	+	+	+	±	-±	- -	+

PRECISIÓN INTERLOTE

Se ensayan tres lotes distintos y en todos ellos se observa que alcanzan la sensibilidad asignada de 16 ng/ml.

Lot		125	62	31	16	8	4	2	1	0
1	Stk 1	+	+	+	+	+	±	-±	- -	+
	Stk 2	+	+	+	+	+	±	-±	- -	+
	Stk 3	+	+	+	+	+	±	-±	- -	+
2	Stk 1	+	+	+	+	+	±	-±	- -	+
	Stk 2	+	+	+	+	+	±	-±	- -	+
	Stk 3	+	+	+	+	+	±	-±	- -	+

3	Stk1	+	+	+	+	+	±	-±	- -	+
	Stk2	+	+	+	+	+	±	-±	- -	+
	Stk3	+	+	+	+	+	±	-±	- -	+

Lot 1: T48 // Lot 2: T43.58 // Lot 3: T44.59

EFECTO HOOK

Muestras de concentraciones que superan en más de 3500 veces el límite de sensibilidad (16 ng/ml) siguen no afectan el resultado.

	Concentration	Concentration
Lot T48.63	50.000 ng/ml POSITIVE	5.000 ng/ml POSITIVE

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Se analizan diferentes sustancias a las concentraciones indicadas y no se aprecia alteración sobre los resultados previstos.

Bilirrubina F 0.9 – 1.1 mg/ml	Acetamidofeno 20 mg/dl
Bilirrubina C 0.9 – 1.1 mg/ml	A. Acetilsalicílico 20 mg/dl
Hemoglobina 22 – 27 ng/ml	Ampicilina 40 mg/dl
A. Ascórbico 100 mg/dl	Atropina 40 mg/dl
Cafeína 40 ng/dl	A. Gentísico 40 mg/dl
Glucosa 2000 mg/dl	Urea 4000 mg/dl
A. Urico 10 mg/dl	

MICROORGANISMOS INTERFERENTES

Los microorganismos indicados, a la concentración descrita no dieron lugar a interferencia en el resultado en la línea de Rotavirus del Producto R-A..

Bacterias. Bacterias CONCENTRACIÓN (McF:5(1x10E8/ml)

E.coli	Groupe G Strep	H.influenzae
K.pneumoniae	S.agalactiae	C.albicans
E.faecalis	S.mutans	B.catarrhalis
S.aureus	S.pneumoniae	B.pertussis
S.epidermidis	S.marcescens	P.vulgaris
S.haemolyticus	P.aeruginosa	S.saprophyticus
Groupe B Strep	N.gonorrhoeae	S.milleri
Groupe C Strep		E.faecium

Virus-1

Virus	Subtipo	Concentración final. ÆÉTICID ₅₀ /Ç IÆË
Influenza type A	H1N1	1.4×10 ₆
Influenza type A	H3N2	3.0×10 ₆

Virus	Subtipo	Concentración final. ÆÉTCID ₅₀ /Ç 1ÆÉ
Influenza type B	Victoria	1.6×10 ₆
Influenza type B	Yamagata	1.5×10 ₇

Virus-2

Virus	Subtipo	Concentración final. ÆÉTCID ₅₀ /Ç 1ÆÉ
Echovirus	6	7.2×10 ₅
Poliovirus	2	2.2×10 ₇
Parainfluenza	2	2.2×10 ₇



STICK ROTAVIRUS /SIMPLE ROTAVIRUS

One-step immunochromatographic test for the detection of rotavirus in stool samples

INTENDED USE

Simple Rotavirus and Stick Rotavirus chromatographic immunoassay is a procedure for qualitative in vitro detection of Rotavirus antigens in fecal matter.

INTRODUCTION

Rotaviruses are the main cause of acute gastroenteritis. Gastroenteritis from enteric viruses can be mortal in risk populations such as children, the elderly or immunosuppressed individuals.

With an incubation period of 1-3 days, infection is via the fecal-oral route. Characteristic symptoms are vomiting, watery diarrhea at 3-8 days, fever and abdominal pain. Immunization following the initial infection is incomplete, although later infections tend to be less severe than the first.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

Simple Rotavirus/Stick Rotavirus tests use monoclonal antibodies against the VP6 antigen of Group A rotaviruses, conjugated to red latex particles and monoclonal antibodies specific against rotavirus in the membrane.

In these tests, the sample is first treated with a sample diluent to extract the rotavirus antigens from the fecal matter. Following extraction, the only step necessary is putting the extract in the reaction device.

When the sample flows through the test membrane, the colored particles migrate. In the case of a positive result, the specific antibodies present in the membrane capture the colored particles.

Lines of different colors will be visible, depending on the virus content in the sample. These lines are used to interpret the result, at five minutes' room-temperature incubation.

KIT CONTENTS

1. Reaction devices (SIMPLE or STICK)

The number of reaction devices in the kit is indicated on the outer kit label after the symbol .

2. Vials containing dilution buffer

The volume of the diluting buffer provided is proportional to the number of strips included and is indicated on the label of the vial containing it.

Note:

In the SIMPLE format, the number of vials provided should be the same as the number of cassettes.

(Example: a 20-unit kit should contain 20 cassettes + 20 vials.)

In the STICK format, the total volume of dilution buffer for all the strips is provided in a single vial.

PRECAUTIONS

1. Patient samples may contain infectious agents and should be treated and discarded as potentially dangerous biological materials.
2. The buffer contains sodium azide as an antimicrobial agent. Avoid direct contact with skin and mucosa. Discard appropriately. Do not use the buffer if there are indications of contamination or precipitation.
3. Do not store or prepare food, eat, drink or smoke in the area where the reagents and samples are handled.
4. Wear disposable gloves when handling the samples. Wash your hands thoroughly when you have finished working.
5. Do not exchange components from kits with different lot numbers.
6. Use all the reagents only in vitro.
7. Before using, let all kit components and samples reach room temperature, because cold reagents and/or samples can reduce test functionality. About 20-30 minutes are usually sufficient for reaching room temperature.
8. Do not use kit components after the expiration dates.
9. If the package is broken, the product can still be used as long as none of the components have been damaged.
10. It is important to add the correct sample amount (4-5 drops of suspension). If less than indicated is used, the chromatography may not occur because the sample may not reach the reaction area; if there is too much, brown lines may appear instead of red ones.
11. The used product should be discarded as indicated by current legislation.

12. Do not use the test if a colored line appears in the result area before you start to use it.
13. It is important to take the appropriate amount of stool sample: 30-50 mg of solid stool or 100 ul of liquid stool. An excessive sample amount prevents correct chromatography.
14. In the case of the STICK product packaged in a tube, it is important to close the tube again immediately after taking the reactive strip out; otherwise, high room humidity might damage the rest of the strips inside the tube.

STORAGE

The kit can be stored at temperatures between 2°C and 30°C. The expiration date is stamped on the package.

SAMPLES

Stool samples should be collected as soon as possible after symptom onset. One week after the first symptoms appear, the virus titer begins to decrease; the viruses can therefore be more difficult to identify.

The samples can be stored in the refrigerator (at approximately 4°C) for 1-2 days before being analyzed. To conserve samples for a longer period, store them in a freezer at -20°C, with no prior handling. In this case, the sample must be completely defrosted, taken to room temperature and homogenized before analysis. Pay special attention when analyzing hemorrhagic samples as they often give false positive results when the blood content is high.

SIMPLE ROTAVIRUS PROCEDURE

1. Important: Take sample from three different sample sites at least, in order to get a sample as much representative as possible.
2. Unscrew the vial cap carefully, so as not to spill the extraction buffer. Collect a sufficient amount of fecal matter (30-50 mg) with the end of the applicator. If the 30-50 stool is liquid, collect 100 microliters with the help of a pipette and transfer to the vial.
3. Introduce the applicator with the specimen into the vial. Screw the cap on tightly and shake vigorously to ensure a homogenous mixture.
4. Take the reaction device out of the aluminum pouch. Discard the small bag of desiccant; it is not used during the test, as its only purpose is to protect the test against moisture.
5. Break the upper end of the vial.
6. Add 4 or 5 drops to the sample area of the reaction device (round window marked with an arrow). Do not add solid particles along with the liquid.
7. Wait 5 minutes then read and interpret the result. minutes,

STICK ROTAVIRUS PROCEDURE

1. Important: Take sample from three different sample sites at least, in order to get a sample as much representative as possible.
2. Take one test tube per sample. Add approximately 1-1.5 ml of buffer.
3. Next, take a small amount of stool (30-50 mg) and 30-50 resuspend it in the buffer. If a cotton swab is used, submerge it in the buffer and press the cotton end against the tube sides, rotating the swab. If the stool is liquid, collect 100 microliters with the help of a pipette and transfer to the vial.
4. Shake vigorously to suspend the sample in the diluent (or vortex for 15 seconds).
5. Wait at least 3 minutes, until the solid particles have settled on the bottom, or centrifuge for 1 minute at 700 x g. Then, with the help of a pipette, transfer 500 microliters of supernatant to another test tube.
6. Take the reaction device out of the aluminum pouch. Discard the small bag of desiccant; it is not used during the test, as its only purpose is to protect the test against moisture.
7. Insert the reactive strip into the 2nd test tube, with the arrows pointing towards the bottom of the tube.

IMPORTANT: The liquid must never reach the area with the arrows. If necessary, use a longer test tube or reduce the sample amount.

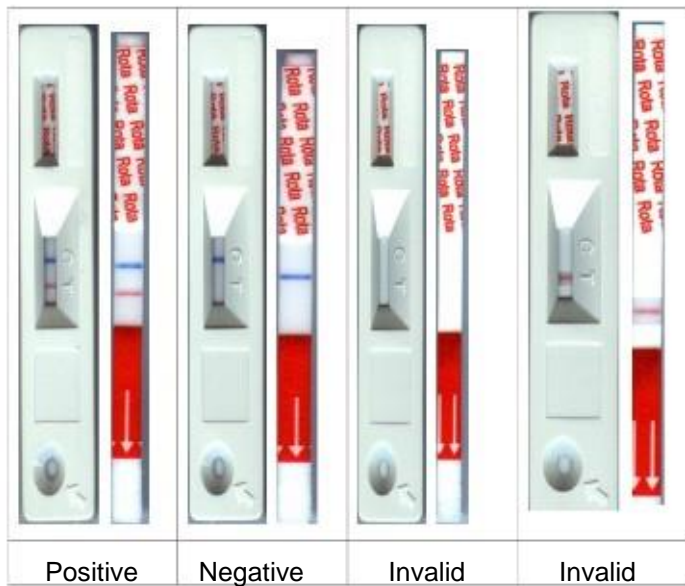
8. Incubate; read the result in the white area on the centre of the strip at 5 minutes.
- Note: The strip can also be inserted into the first test tube or vial, as long as it is long enough for the liquid not to reach the area with the arrows. However, on rare occasions, absorption can be hindered due to a very concentrated sample. Alternatively, the strip can be submerged in the first test tube for 10 seconds (without going past the tips of the arrows) and then left to react on a horizontal surface.

READING RESULTS

NEGATIVE:NEGATIVE: There is only a single vertical BLUE line in the middle of the reaction strip, This line should always appear. (In the SIMPLE test, the line is aligned with the letter "C" (Control) on the device frame.)

POSITIVE:POSITIVE: In addition to the BLUE control line, a PINK/RED line also appears in the middle of the reaction strip. (In the SIMPLE test, this line is aligned with the letter "T" on the device frame.) The color will vary in intensity according to the antigen concentration present. The test is INVALID if no blue line appears because the procedure was not followed correctly, the reagents have deteriorated or because an incorrect amount of sample was added. Repeat the test with a new reaction device. For blood samples, it is advisable the use of an alternative technique because the problem of

destabilization does not usually depend on the strip but of the sample matrix.



Any line that may appear after 5 minutes due to the nature of the sample has no diagnostic value. Final diagnosis should not be based on only the result from one test. The diagnosis should be established by the correlation of test results with other appropriate data and with clinical symptoms.

QUALITY CONTROL

The test is invalid if no blue line appears, whether because the test was not performed properly or the reagents have deteriorated. Repeat the test, preparing the proper amount of sample.

PROCEDURE LIMITATIONS

1. The test should be used only for detecting Rotavirus antigens in stool samples.
2. This is a qualitative test; no quantitative interpretation of the result should be made with respect to the intensity of the positive line.
3. Over 200 samples were evaluated to ensure proper test functioning. The correlation of results with other techniques (ELISA) was excellent. However, interferences in the test performance cannot be excluded.
4. If there is an excessive sample amount, brown lines may appear instead of red ones. These brown lines have no diagnostic value. If this happens, repeat the test with a smaller amount of stool sample or dilute the previously-prepared extract.
5. No crossed reaction with other viruses or other substances has been observed during test evaluation. A negative result does not totally exclude the possibility of Rotavirus infection. The importance of the results should be evaluated in relation to the patient's clinical symptoms.

6. The analysis of some samples can produce lines of imprecise color, caused by negative samples in the majority of the cases. The test should be repeated if lines of indeterminate color appear. If the same result is obtained again, the analysis should be performed with another analytic method.

7. It is observed that faecal samples with a high blood content may interfere negatively with the test. In these cases, specificity problems (false positive results) may appear with negative samples.

DETECTION THRESHOLD

Numerous assays have been performed with different observers, under different conditions and lots; based on this, the test is observed to detect 16 ng/ml of virus proteins at 5 minutes without any problems.

with different
with different
to detect 16
without any

SENSITIVITY AND SPECIFICITY

STICK Rotavirus has been compared to Ridascreen ELISA (r-Biopharm, Darmstadt, Germany) in a study. The results are summarized in the following table:

Rotavirus		101 samples		OPERON	
				+	-
ELISA	+	11	90	14	87
	-			11	0
Ridascreen	+	11	90	3	87
	-				
				Sensitivity	>99,9%
				Specificity	96,6%
				Positive Predictive value	78,6%
				Negative Predictive value	>99,9%

REPEATABILITY

INTRA-ASSAY PRECISION

The precision analyzed with 10 assays at 8 different antigen concentration shows an elevated repeatability.

	125	62	31	16	8	4	2	0
+	+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	+	±	-	-

**REPRODUCIBILITY
INTER-DAY PRECISION**

Eight different samples having different antigen concentrations were assayed over 10 consecutive days, obtaining elevated reproducibility and concordance in all the days analyzed.

Day	125	62	31	16	8	4	2	0
1	+	+	+	+	+	±	- ±	- -
2	+	+	+	+	+	±	- ±	- -
3	+	+	+	+	+	±	- ±	- -
4	+	+	+	+	+	±	- ±	- -
5	+	+	+	+	+	±	- ±	- -
6	+	+	+	+	+	±	- ±	- -
7	+	+	+	+	+	±	- ±	- -
8	+	+	+	+	+	±	- ±	- -
9	+	+	+	+	+	±	- ±	- -
10	+	+	+	+	+	±	- ±	- -

INTER-LABORATORY PRECISION

Three different laboratory technicians assayed those same samples, finding that the 16-ng/ml sensitivity limit was always reached.

		125	62	31	16	8	4	2	1	0
1	Stk 1	++	+	+	+	+	±	- ±	- -	+
	Stk 2	++	+	+	+	+	±	- ±	- -	+
2	Stk 1	++	+	+	+	+	±	- ±	- -	+
	Stk 2	++	+	+	+	+	±	- ±	- -	+
3	Stk 1	++	+	+	+	+	±	- ±	- -	+
	Stk 2	++	+	+	+	+	±	- ±	- -	+

INTER-LOT PRECISION

Three different lots were assayed; in all of them, the assigned sensitivity of 16 ng/ml was reached.

Lot		125	62	31	16	8	4	2	1	0
1	St k1	++	+	+	+	+	±	- ±	- -	+
	St k2	++	+	+	+	+	±	- ±	- -	+

	St k3	++	+	+	+	+	±	- ±	- -	+
2	St k1	++	+	+	+	+	±	- ±	- -	+
	St k2	++	+	+	+	+	±	- ±	- -	+
	St k3	++	+	+	+	+	±	- ±	- -	+
3	St k1	++	+	+	+	+	±	- ±	- -	+
	St k2	++	+	+	+	+	±	- ±	- -	+
	St k3	++	+	+	+	+	±	- ±	- -	+

HOOK EFFECT

Samples having concentrations that exceeded the sensitivity limit (16 ng/ml) by over 3500 times did not affect the results.

	Concentration	Concentration
Lot T48.63	50.000 ng/ml POSITIVE	5.000 ng/ml POSITIVE

Lot 1: T48 // Lot 2: T43.58 // Lot 3: T44.59

INTERFERING SUBSTANCES

The substances indicated in the following table were analyzed; at the concentrations specified, no alterations of the results were found.

Bilirubin F 0.9 – 1.1 mg/ml	Acetaminophen 20 mg/dl
Bilirubin C 0.9 – 1.1 mg/ml	Acetylsalicylic Acid 20 mg/dl
Hemoglobin 22 – 27 ng/ml	Ampicillin 40 mg/dl
Ascorbic Acid 100 mg/dl	Atropine 40 mg/dl
Caffeine 40 ng/dl	A. Gentsic Acid 40 mg/dl
Glucose (2,000 mg/dl)	Urea 4000 mg/dl
Uric Acid 10 mg/dl	

INTERFERING MICROORGANISMS

The microorganisms indicated in the following table, at the concentrations specified, did not cause any interference in results, using the Rotavirus line of Product R-A.

Bacteria.Bacteria CONCENTRATION (McF:5(1x10E8/ml)

E. coli	Group G Strep	H. influenzae
K. pneumoniae	S. agalactiae	C. albicans
E. faecalis	S. mutans	B. catarrhalis
S. aureus	S. pneumoniae	B. pertussis
S. epidermidis	S. marcescens	P. vulgaris

E. coli	Group G Strep	H. influenzae
S. haemolyticus	P. aeruginosa	S. saprophyticus
Group B Strep	N. gonorrhoeae	S. milleri
Group C Strep		E. faecium

Virus-1

Virus	Subtype	Final Concentration ($\text{ÆÉT CID}_{50}/\text{Ç l}$)
Influenza type A	H1N1	1.4×10^6
Influenza type A	H3N2	3.0×10^6
Influenza type B	Victoria	1.6×10^6
Influenza type B	Yamagata	1.5×10^7

Virus-2

Virus	Subtype	Final Concentration ($\text{ÆÉT CID}_{50}/\text{Ç l}$)
Echovirus	6	7.2×10^5
Poliovirus	2	2.2×10^7
Parainfluenza	2	2.2×10^7

FR

STICK ROTAVIRUS /SIMPLE ROTAVIRUS

Test immunochromatographique en une seule étape pour la détection de rotavirus dans les selles.

FINALITÉ PRÉVUE

L'immuno-essai chromatographique Simple Rotavirus ou Stick Rotavirus est une procédure de détection qualitative in vitro d'antigènes de rotavirus dans la matière fécale.

INTRODUCTION

Les rotavirus sont la principale cause de gastroentérite aiguë. Les gastroentérites par virus entériques peuvent s'avérer mortelles chez des populations à risque telles que les enfants, les personnes âgées ou des individus dont les défenses immunitaires sont affaiblies. Leur transmission a lieu par voie orale-fécale, et la période d'incubation dure entre 1 et 3 jours. Les symptômes caractéristiques sont des vomissements, une diarrhée aqueuse pendant entre 3 et 8 jours, de la fièvre et des douleurs abdominales. L'immunisation après la première infection est incomplète, mais les infections postérieures sont en général moins graves que l'infection initiale.

PRINCIPES BIOLOGIQUES


Le test Stick Rotavirus / Simple Rotavirus utilise des anticorps monoclonaux contre l'antigène VP6 du groupe A des rotavirus, combinés à des particules de latex rouges et à des anticorps monoclonaux spécifiques pour les rotavirus au niveau de la membrane.

Dans ce test, l'échantillon est traité tout d'abord avec un diluant d'échantillon pour extraire les antigènes de rotavirus des selles. Après l'extraction, il ne reste qu'à placer l'extrait dans le dispositif de réaction.

Lorsque l'extrait de l'échantillon circule à travers la membrane du test, les particules colorées migrent. En cas de résultat positif, les anticorps spécifiques, présents dans la membrane, captureront les particules colorées. Diverses lignes de couleur seront visibles en fonction de la teneur en virus de l'échantillon. Ces lignes sont utilisées pour l'interprétation du résultat, après cinq minutes d'incubation à température ambiante.

MATÉRIEL INCLUS DANS LE KIT

- Dispositifs de réaction (cassettes ou bandelettes)
- Flacons avec le tampon de dilution

Le nombre de dispositifs de réaction du kit est indiqué sur l'étiquette externe du kit, après le symbole . Le volume de tampon diluant fourni est proportionnel au nombre de bandelettes incluses, et il est indiqué sur l'étiquette du flacon qui le contient.

Indication :

Dans le format simple, le nombre de flacons fournis doit être égal au nombre de cassettes (exemple : le kit de 20 unités doit contenir 20 cassettes + 20 flacons).

Dans le format stick, le volume total de tampon de dilution pour toutes les bandelettes est fourni dans un seul flacon.

PRÉCAUTIONS

- Les échantillons peuvent contenir des agents infectieux et devront être traités et éliminés comme des matériaux biologiques potentiellement dangereux.
- Le tampon contient de l'azote de sodium comme agent antimicrobien. Éviter le contact direct avec la peau et les muqueuses. Mettre au rebut de manière appropriée. Ne pas utiliser le tampon s'il présente des signes de contamination ou de précipitation.
- Ne pas manger, boire, fumer, stocker ou préparer des aliments dans la zone où sont manipulés les réactifs et les échantillons.
- Porter des gants jetables pour manipuler les échantillons. Se laver soigneusement les mains une fois le travail terminé.
- Ne pas échanger les composants de kits présentant un numéro de lot différent.

6. N'utiliser l'ensemble des réactifs qu'in vitro.
7. Avant de les utiliser, laisser tous les composants du kit et les échantillons atteindre la température ambiante, car des réactifs et/ou des échantillons froids peuvent réduire l'efficacité du test. Il est recommandé d'attendre entre 20 et 30 minutes pour atteindre la température ambiante.
8. Ne pas utiliser les composants du kit après les dates de péremption.
9. En cas de rupture de l'emballage, le produit peut être utilisé si aucun des composants n'a été endommagé.
10. Il est important d'ajouter la bonne quantité d'échantillon (4 à 5 gouttes de suspension). Si celle-ci est inférieure à celle indiquée, il est possible que la chromatographie ne se réalise pas parce que l'échantillon n'arrivera pas à la zone de réaction, et si elle est supérieure, des lignes marron pourront apparaître au lieu des lignes rouges.
11. Le produit usagé devra être éliminé conformément à la législation en vigueur.
12. Ne pas utiliser le test si une ligne de couleur apparaît dans la zone des résultats avant de commencer à l'utiliser.
13. Il est important de collecter la bonne quantité de matière fécale : 30-50 mg de selles solides ou 100 µl de selles liquides. Un excès d'échantillon empêche la réalisation d'une chromatographie correcte.
14. Dans le cas du produit Stick conditionné en tube, il est important de le refermer immédiatement une fois la bandelette réactive retirée, car une humidité environnementale élevée pourrait affecter le reste des bandelettes qui se trouvent encore à l'intérieur du tube.

CONSERVATION

Le test peut être conservé à toute température comprise entre 2 et 30°C. Et sa date de péremption est imprimée sur l'emballage.

ÉCHANTILLONS

Les échantillons de selles doivent être collectés dès que possible après l'apparition des symptômes. Une semaine après l'apparition des premiers symptômes, le titre des virus commence à se réduire et ils peuvent ainsi s'avérer plus difficiles à identifier.

Les échantillons peuvent être conservés au réfrigérateur (à environ 4°C) pendant 1 à 2 jours avant d'être analysés. Pour une conservation plus longue, ils doivent être maintenus au congélateur à -20°C sans aucune manipulation préalable. Dans ce cas, l'échantillon sera décongelé totalement, jusqu'à température ambiante, et homogénéisé avant de procéder à l'analyse.

Faire attention pour l'analyse des échantillons hémorragiques qui donnent souvent des problèmes de non-spécificité lorsque la teneur en sang est élevée.

PROCÉDURE SIMPLE ROTAVIRUS

1. Importante: Prendre des selles d'au moins trois parties différents de l'échantillon pour obtenir un échantillon autant représentatif que possible.
2. Dévisser soigneusement le bouchon du flacon afin de ne pas renverser le tampon d'extraction. À l'aide de l'extrémité de l'appliqueur, collecter une quantité suffisante de selles (30 – 50 mg Si les selles sont mg). 30 liquides, collecter 100 microlitres avec une pipette et les transvaser dans le flacon.
3. Introduire l'appliqueur avec l'échantillon dans le flacon. Bien revisser le bouchon et agiter vigoureusement pour assurer un mélange homogène.
4. Sortir le dispositif de réaction de l'enveloppe en aluminium. Jeter le sachet de produit desséchant, étant donné que celui-ci ne sert qu'à préserver le test de l'humidité et qu'il n'est pas utilisé pour la réalisation du test.
5. Rompre l'extrémité supérieure du flacon.
6. Ajouter 4 à 5 gouttes dans la zone d'accueil de l'échantillon du dispositif de réaction (la fenêtre circulaire indiquée par une flèche). Ne pas ajouter de particules solides avec le liquide.
7. Attendre 5 minutes puis lire et interpréter le résultat. minutes,

PROCÉDURE STICK ROTAVIRUS

1. Importante: Prendre des selles d'au moins trois parties différents de l'échantillon pour obtenir un échantillon autant représentatif que possible
 2. Utiliser un tube à essai par échantillon. Ajouter environ 1- 1,5 ml de tampon..
 3. Ensuite, collecter une petite quantité de selles (30 – 50 mg) et la resuspendre dans le tampon. En cas d'utilisation d'un écouvillon, l'immerger dans le tampon et appuyer le tampon de coton contre les parois du tube en le faisant pivoter. Si les selles sont liquides, collecter 100 microlitres d'échantillon avec une pipette.
 4. Agiter vigoureusement pour obtenir une suspension de l'échantillon dans le diluant (il est également possible de l'agiter dans le vortex pendant 15 secondes).
 5. Attendre au moins 3 minutes, jusqu'à ce que les particules solides se soient déposées au fond, ou centrifuger pendant une minute à 700 x g, et transférer à l'aide d'une pipette 500 microlitres du liquide surnageant dans un autre tube à essai.
 6. Sortir la bandelette de réaction de l'enveloppe en aluminium. Jeter le sachet de produit desséchant, étant donné que celui-ci ne sert qu'à préserver le test de l'humidité et qu'il n'est pas utilisé pour la réalisation du test.
 7. Introduire la bandelette réactive dans le deuxième tube à essai, avec les flèches orientées vers le fond du tube.
- IMPORTANT** : le liquide ne doit jamais atteindre la zone

signalée par les flèches. Si nécessaire, utiliser un tube plus long ou réduire la quantité d'échantillon.

8. Attendre 5 minutes et lire le résultat au niveau de la zone centrale blanche de la bandelette.

Remarque : la bandelette peut aussi être introduite dans le premier tube ou flacon, dans la mesure où celui-ci est assez grand pour que le liquide n'atteigne pas la zone signalée par les flèches. Cependant, il est rare de rencontrer des difficultés en ce qui concerne l'absorption lorsque l'on utilise un échantillon très concentré. Il est également possible de tremper la bandelette pendant 10 secondes dans le premier tube, en évitant de dépasser la pointe des flèches, puis de la laisser réagir sur une surface horizontale.

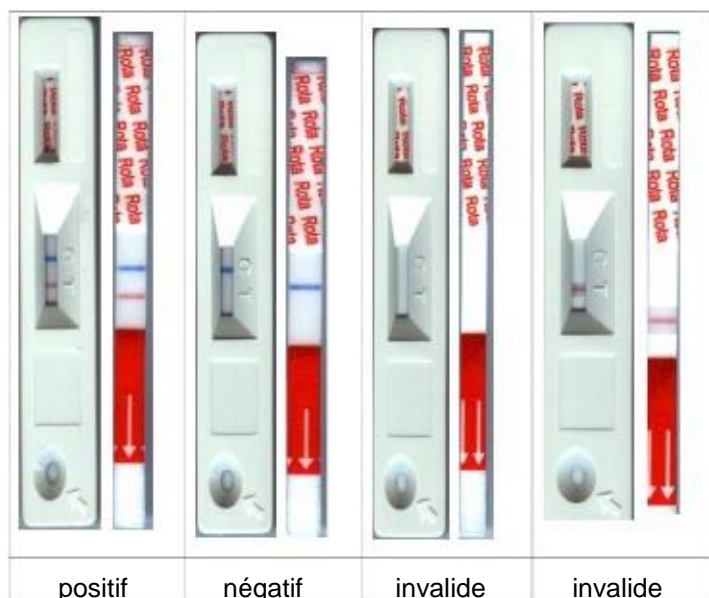
LECTURE DES RÉSULTATS

NÉGATIF : seule une ligne transversale BLEUE apparaît dans la zone centrale de la bandelette de réaction. Cette ligne doit toujours apparaître (et elle doit toujours être alignée avec la lettre « C » (contrôle) indiquée sur le dispositif).

POSITIF : en plus de la ligne BLEUE de contrôle, une autre ligne ROUGE/ROSE apparaît dans la zone centrale de la bandelette de réaction (toujours alignée avec la lettre « T » indiquée sur le dispositif). L'intensité de cette coloration sera variable selon la concentration présente de l'antigène.

Si la ligne bleue n'apparaît pas, le test est **INVALIDE**, parce que la procédure n'a pas été suivie correctement, parce que les réactifs se sont détériorés ou parce que la quantité d'échantillon ajoutée était incorrecte. Renouvelez le test avec un nouveau dispositif de réaction.

En cas d'échantillons contenant du sang, il est recommandé d'utiliser une technique alternative, le problème de stabilité ne dépendant pas en général du test employé mais de la matrice de l'échantillon.



Toute ligne pouvant apparaître, du fait de la nature de l'échantillon, après le délai de 10 minutes n'aura aucune valeur en termes de diagnostic.

Le diagnostic final ne devra pas être basé uniquement sur le résultat d'un test. Il devra être fondé sur la corrélation des résultats du test avec d'autres données appropriées et avec la symptomatologie clinique.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Si aucune ligne bleue n'apparaît, le test est invalide, soit parce qu'il n'a pas été correctement réalisé, soit parce que les réactifs se sont détériorés. Renouvelez le test en préparant une quantité appropriée d'échantillon.

LIMITES DE LA PROCÉDURE

1. Le test ne doit être utilisé que pour la détection d'antigènes de rotavirus dans les selles.
2. Le test est qualitatif et aucune interprétation quantitative du résultat ayant une relation directe avec l'intensité de la ligne positive ne doit être effectuée.
3. Plus de 200 échantillons ont été utilisés pour garantir le bon fonctionnement du test. La corrélation des résultats avec d'autres techniques (ELISA) s'est avérée excellente. Toutefois, des interférences dans le fonctionnement du test ne peuvent pas être écartées.
4. Un excès d'échantillon pourra faire apparaître des lignes marron au lieu des lignes rouges. Ces lignes marron n'ont aucune valeur en termes de diagnostic. Dans ce cas, le test doit être réalisé à nouveau avec une quantité d'échantillon inférieure ou avec une dilution de l'extrait déjà obtenu.
5. Nous n'avons observé aucune réaction croisée avec d'autres virus ou substances au cours de l'évaluation du test. Un résultat négatif n'exclut pas totalement une possible infection par rotavirus. L'importance des résultats doit être évaluée parallèlement aux symptômes cliniques du patient.
6. L'analyse de certains échantillons pourra produire des lignes présentant des couleurs indéfinies, générées dans la majorité des cas par des échantillons négatifs. Si ces lignes de couleur indéfinie apparaissent, le test doit être répété. Si l'on obtient le même résultat, il est suggéré de réaliser l'analyse à l'aide d'une autre méthode analytique.
7. Il a été constaté que les échantillons fécaux avec une teneur élevée en sang interfèrent négativement dans le test, des problèmes de non spécificité peuvent apparaître avec des échantillons négatifs pour le Rotavirus

SEUIL DE DÉTECTION

Sur la base d'une multitude de tests avec des observateurs différents, dans des conditions différentes et avec des lots différents, nous avons observé que le test détecte sans problème 16 ng/mL de protéines virales après 5 minutes.

SENSIBILITÉ ET SPÉCIFICITÉ

Nous avons effectué une étude comparative du Stick Rotavirus par rapport à l'ELISA Ridascreen (de r-Biopharm, Darmstadt, en Allemagne). Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Rotavirus		101 échantillons		OPERON	
			+	-	
ELISA	+		14	87	
Ridascreen	-	11	3	0	87
		Sensibilité	>99,9%		
		Spécificité	96,6%		
		Valeur prédictive positif	78,6%		
		Valeur prédictive négatif	>99,9%		

RÉPÉTIBILITÉ

PRÉCISION INTRA-TESTS

La précision analysée à travers 10 tests avec 8 concentrations différentes d'antigène présente une répétibilité élevée.

	125	62	31	16	8	4	2	0
+	+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	+	±	-	-
+	+	+	+	+	+	±	-	-

REPRODUCTIBILITÉ

PRÉCISION INTER-JOURS

Nous avons testé 8 échantillons à des concentrations différentes pendant 10 jours, et nous avons obtenu une reproductibilité et une correspondance élevées au cours de chacune des journées d'analyse.

Jour	125	62	31	16	8	4	2	0
1	+	+	+	+	+	±	-	-
2	+	+	+	+	+	±	-	-
3	+	+	+	+	+	±	-	-
4	+	+	+	+	+	±	-	-
5	+	+	+	+	+	±	-	-

6	+	+	+	+	+	±	-	-
7	+	+	+	+	+	±	-	-
8	+	+	+	+	+	±	-	-
9	+	+	+	+	+	±	-	-
10	+	+	+	+	+	±	-	-

PRÉCISION INTER-LABORATOIRES

Trois laboratoires - opérateurs différents ont testé les mêmes échantillons et ont observé que la limite de sensibilité de 16 ng/ml est toujours atteinte.

		125	62	31	16	8	4	2	1	0
1	Stk 1	++	+	+	+	+	±	-	-	+
	Stk 2	++	+	+	+	+	±	-	-	+
2	Stk 1	++	+	+	+	+	±	-	-	+
	Stk 2	++	+	+	+	+	±	-	-	+
3	Stk 1	++	+	+	+	+	±	-	-	+
	Stk 2	++	+	+	+	+	±	-	-	+

PRÉCISION INTER-LOTS

Nous avons testé trois lots différents et avons observé dans chacun d'entre eux qu'ils atteignent la sensibilité attribuée de 16 ng/ml.

Lot		125	62	31	16	8	4	2	1	0
1	Stk1	+	+	+	+	+	±	-	-	+
	Stk2	+	+	+	+	+	±	-	-	+
	Stk3	+	+	+	+	+	±	-	-	+
2	Stk1	+	+	+	+	+	±	-	-	+
	Stk2	+	+	+	+	+	±	-	-	+
	Stk3	+	+	+	+	+	±	-	-	+
3	Stk1	+	+	+	+	+	±	-	-	+
	Stk2	+	+	+	+	+	±	-	-	+
	Stk3	+	+	+	+	+	±	-	-	+

Lot 1 : T48 // Lot 2 : T43.58 // Lot 3 : T44.59

EFFET HOOK

Des échantillons présentant des concentrations plus de 3 500 fois supérieures à la limite de sensibilité (16 ng/ml) n'affectent pas le résultat.

	Concentration	Concentration
Lot T48.63	50.000 ng/ml POSITIVE	5.000 ng/ml POSITIVE

SUBSTANCES INTERFÉRENTES

Nous avons analysé diverses substances avec les concentrations indiquées et n'avons observé aucune altération en ce qui concerne les résultats prévus.

Bilirrubine F 0.9 – 1.1 mg/ml	Acétaminophène 20 mg/dl
Bilirrubine C 0.9 – 1.1 mg/ml	A. Acétilsalicylique 20 mg/dl
Hémoglobine 22 – 27 ng/ml	Ampicilline 40 mg/dl
A. Ascorbique 100 mg/dl	Atropine 40 mg/dl
Caféine 40 ng/dl	A. Gentisique 40 mg/dl
Glucose 2000 mg/dl	Urée 4 000 mg/dl
A. Urique 10 mg/dl	

MICROORGANISMES INTERFÉRENTS

Les microorganismes indiqués, à la concentration spécifiée, n'ont donné lieu à aucune interférence dans le résultat dans la ligne de rotavirus du produit R-A.

Bactéries. Bactéries CONCENTRATION (McF:5(1x10E8/ml))

E.coli	Groupe G Strep	H.influenzae
K.pneumoniae	S.agalactiae	C.albicans
E.faecalis	S.mutans	B.catarrhalis
S.aureus	S.pneumoniae	B.pertussis
S.epidermidis	S.marcescens	P.vulgaris
S.haemolyticus	P.aeruginosa	S.saprophyticus
Groupe B Strep	N.gonorrhoeae	S.milleri
Groupe C Strep		E.faecium

Virus-1

Virus	Sous-type	Concentration finale/ÆÉT CID ₅₀ /Ç IÆÉ
Influenza type A	H1N1	1.4x10 ⁶
Influenza type A	H3N2	3.0x10 ⁶
Influenza type B	Victoria	1.6x10 ⁶
Influenza type B	Yamagata	1.5x10 ⁷

Virus-2

Virus	Sous-type	Concentration finale/ÆÉT CID ₅₀ /Ç IÆÉ
Echovirus	6	7.2x10 ⁵
Poliovirus	2	2.2x10 ⁷
Parainfluenza	2	2.2x10 ⁷

BIBLIOGRAFÍA / REFERENCES / LITERATURE

- F. Bon et al. Prevalence of a group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France Journal of Clinical Microbiology, Sept. 1999, p. 3055-3058
- Bodo R. Eing et al. Evaluation of two enzyme immunoassays for detection of human rotaviruses in fecal specimens, Journal of Clinical Microbiology, Dec. 2001, p.4532-4534
- Umesh D. Parashar et al. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children, Emerging Infectious Diseases, vol. 9, No.5, May 2003, p. 565-572



Fecha de caducidad / Expiry date / Date de péremption



Número de lote / Lot number / Numéro de lot



Uso diagnóstico in vitro / For in vitro diagnostic use / Usage in vitro



Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro. / This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices. / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79 CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. Número de catálogo / Catalogue number / Référence article



Leer instrucciones de uso / Please read pack insert / Lire attentivement le mode d'emploi



Fabricado por / Manufactured by / Fabriqué par



Contenido suficiente para <n> ensayos / Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour "n" tests



Conservar a / Store at / Conserver entre



Distribuidor / Distributor / Distributeur



DO-090545 Rev.11 – 23.10.2014



OPERON, S.A. - Camino del Plano, 19 - E-50410 Cuarte de Huerva - (Zaragoza) – ESPAÑA

Anexo 2

(60) SECOND TIME INTERVAL, IS A POSITIVE TEST RESULT. Any positive result should be followed up by further diagnostic procedures to determine the source of the occult bleeding.

LIMITATION OF THE PROCEDURE

Results obtained with hema-screen™ are designed for preliminary screening only and are not intended to replace diagnostic procedures such as barium enema, proctosigmoidoscopic examination or other X-ray studies. The test should not be considered as conclusive evidence for the presence or absence of gastrointestinal bleeding or pathology. Individuals suffering from color blindness should not interpret this test. Gastrointestinal cancers and adenomas do not always bleed.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Independent studies have shown that hema-screen™ guaiac impregnated slides are capable of detecting 0.6 mg Hb/gm of feces¹⁰. Gregor^{3,7,12,13}, pioneered the use of guaiac paper slides like those supplied by Immunostics, Inc. for the detection of colorectal cancer in office-practice patients. Screening 900 patients, his reports show a positive rate of 5% (utilizing barium enema examination), 1% were shown to have asymptomatic colon cancer, 3% had some other type of bowel pathology, and 1% were false positive results.

Other studies from 2000 physicians who had used the guaiac paper slides in their practices over a six month period, detected colon cancer in 47 patients in which there were no signs other than the positive guaiac slide test. In the data which was collected by Gregor, there were no false negative results. Another study conducted on 20 healthy volunteers by Ostrow et al, involved instilling via nasogastric tube various quantities of radioactive chromium-tagged red cells (Cr51)¹¹. The reactions obtained with guaiac paper slides were found to be about one-quarter as sensitive as the chemical tests such as benzidine and orthotolidine but overcomes both the instability of guaiac solutions and the hypersensitivity of benzidine and orthotolidine.

REFERENCES

1. JAMA, 141:1213-1217, 1949.
2. American Cancer Society, 1982 Facts and Figures.
3. Gregor, D.H., Detection of Silent Colon Cancer in Routine Examination, *Cancer*, 19:330, 1969.
4. Cited in Irons, G.V. Jr and Kirsner, J.B., Routing Chemical Test of the Stool for Occult Blood; An Evaluation, *Amer. J.M. Sc.* 249:247-260, 1965.
5. Kratochvil, J.F. Burns, R. H., Soikel, M K., and Haskin, J. M., Isolation and Characterization of Alpha Guaiaconic Acid and the Nature of Guaiacum Blue, *Phytochem.* 10:2529-2531, 1971.
6. Thornton, G.H. and Illingsworth, DG., *Gastroenterology*, 28-593, 1955. 7 Gregor, D.H., Occult Blood Testing for Detection of Asymptomatic Colon Cancer, *Cancer* 28:131, 1971.
8. Ostrow, J.D, Mulvanoy, C A., Hansell, J.R., and Rhodes, R S., Sensitivity and Reproducibility of Chemical Tests for Fecal Occult Blood with an Emphasis on False-Positive Reactions, *Amer. J. Digest. Dis.*, 18:930 940, November, 1973.
9. Grossman, M I Mastsumoto, K.K., and Lichter, R.J., Fecal Blood Loss Produced by Oral and Intravenous Administration of various Salicylates, *Gastroenterology*, 40:383388 1961.
10. MDA evaluation (MDA/2000/05): "Evaluation of eleven faecal occult blood test kits" completed in 1999, and GMEC evaluation: Report for the NHSCSP: Four faecal occult blood test kits" July 2005 - www.surrey.ac.uk/mhra.
11. Roche, M., Perez-Gimerez, M.E., Layrisse, M, and DiPrisco, E, Clemens, T. Jr, Rodman G., and Peterson, R.E., Study of the urinary and Fecal Extraction of Radioactive Chromium Cr51, In *Man: Its use in the Measurement of Intestinal Blood Associated with Hookworm Infestation*, J. Clin Invest., 36:1183, 1957.
12. Gregor, D.H., Diagnosis of Large Bowel Cancer in the Asymptomatic Patient, *JAMA* 201:943-945, 1967.
13. Gregor D.H., A Progress Report - Detection of Colorectal cancer using Guaiac Slides *Cancer*, 22(6)360 (November-December) 1972
14. Caligiore, P, MacRae, FA., St. John, D.J.B., Ragner, L.J. and Legge JW., Peroxidase Levels in Food: Reference to Colorectal Cancer Screening, *Amer. J. Clin Nutr.* 36:1487-1489, 1982.
15. Lifton, L J., and Kreiser J., False-Positive Stool Occult Blood Tests Caused by Iron Preparations. A Controlled Study and Review Literature, *Gastroenterology*, 83:860863, 1982.

WARRANTY

All Immunostics Inc. products are warranted to perform as described in their labeling. All other warranties, including the warranty of MERCHANTABILITY and FITNESS FOR USE are excluded. In no event shall Immunostics Inc. be liable for any indirect or consequential damages. Further, any modification of the product or procedure voids any and all warranties. In no event shall Immunostics' liabilities for damaged or defective product exceed the purchase price paid there for.



hema-screen™

INTENDED USE

hema-screen™ is a rapid, convenient, and non-offensive qualitative method for detecting occult blood in the stool. It is intended for professional use as an aid in the diagnosis of asymptomatic gastrointestinal conditions that may manifest themselves by the presence of occult blood in the stool. This test is recommended for use in routine hospital testing, mass screening programs for colorectal cancer, and in testing of postoperative patients and newborn infants.

SUMMARY AND EXPLANATION

Clinical experience has shown that after proper dietary preparations, occult blood testing in the stool has provided both patients and physicians with a parameter of detecting asymptomatic gastrointestinal conditions, such as colorectal cancer, ulcers, polyps, anemia, and diverticulosis. Cancer of the colon and rectum strikes over 123,000 men and women in the United States each year. It is second only to skin cancer as a killer. If the disease is localized, the number of patients who

survive for five years approaches 70%. In localized asymptomatic disease 90% of patients survive five years. The American Cancer Society estimates that early diagnosis and prompt treatment could save two-thirds of 53,000 Americans who die annually of the disease. "If guaiac screening, plus digital rectal examination and sigmoidoscopy were included in all annual physical examinations many more cases of colorectal cancer could be detected in a stage amenable to cure", Gregor. Van Deen: is generally credited with the discovery that gum guaiac, a natural resin extracted from the wood *Guaiaecum Officinale*, is the method of choice for detecting occult blood in feces².

The basis of the test is that hemoglobin exerts a peroxidase-like activity and causes the oxidation of a phenolic compound (alpha guaiaconic acid) by hydrogen peroxide to a quinone structure³. Since the structure of hematin is similar to peroxidase, it is probably this

fraction of the hemoglobin which catalyzes the oxidation of guaiac. hema-screen™ slides feature special electrophoresis filter paper impregnated with guaiac. Since the guaiac is not in solution, it will remain stable for three years. Comparing the reactions obtained with guaiac paper slides and other chemical methods such as benzidine and orthotolidine, for detecting fecal blood, the guaiac slide method was found to be about one-quarter as sensitive as the chemical tests, but overcomes both the instability of guaiac solutions and the hypersensitivity of benzidine and orthotolidine. hema-screen™ in its

original concept as slides and tape was designed to offer the hospital, mass screening programs and clinical laboratories a convenient rapid method for handling fecal specimens in testing for occult blood.

hema-screen™ eliminates the mess and odors associated with the collection and transport of fecal specimens. Slides can be prepared at the patient's bedside and placed in a sealed envelope or by the patient at home and mailed to the hospital or laboratory in an unoffensive manner for development and evaluation.

hema-screen™ single slides are convenient for use when single stool specimens are to be tested. A single test is indicated when blood loss in the gastrointestinal tract is strongly suspected, for example, in persons with symptoms of ulcers, anemia, black stools or postoperative patients. hema-screen™ Patient Packs are to be utilized so the patient can serially collect specimens at home over the course of three bowel movements. Patients should be instructed to follow the directions exactly, as the potential for false positive results exists due to improper diet, blood on the hands, hemorrhoids or if the test is used during menstrual bleeding. After all three slides are prepared, the slides may be sent back to the hospital laboratory for developing and evaluation. Preparation of three consecutive slides is recommended for screening asymptomatic patients by the American Cancer Society.



CLIA Category

immunostics, inc.

WAIVED

PRINCIPLES OF THE TEST

When stool specimens containing occult blood are applied to hema-screen™ test paper, the hemoglobin portion of the occult blood comes in contact with the guaiac. When the hema-screen™ peroxide developing solution is added, a guaiac-peroxidase like reaction occurs. The chemical reaction becomes visible by the appearance of a blue-green color between 30 seconds and 60 seconds if occult blood is present.

MATERIALS PROVIDED

hema-screen™ Slides — A special electrophoresis paper impregnated with natural guaiac resin. Contains both positive (+) and negative (-) performance standards. The positive (+) standard contains a hemoglobin derived catalyst on the slide.

hema-screen™ Developing Solution - Contains a stabilized mixture of hydrogen peroxide (less than 6%) and 75% denatured ethyl alcohol in aqueous solution.

hema-screen™ Laboratory Pack — Instructions for use, 100 single slides with Performance Standards, two (2) 10 ml bottles of Developing Solution, and 100 applicator sticks. Also available in 50 pack.

hema-screen™ Patient Pack — Instructions for use, 150 patient slides with Performance Standards, three (3) 10 ml bottles of Developing Solution, 150 applicator sticks, patient instructions, and 50 foil-lined mailing pouches.

MATERIALS NEEDED BUT NOT PROVIDED

Clock or timer.

STORAGE CONDITIONS

hema-screen™ Test Slides - Store at room temperature (15°-30°C or 59°-86°F). Do not refrigerate or freeze. Protect from heat, humidity and light. Do not store with volatile chemicals, e.g. iodine, chlorine (bleach), bromine or ammonia. When stored as recommended, slides will maintain sensitivity up to three years from date of manufacture. The guaiac slides are beige in color. However, if not stored as recommended, they may discolor and turn blue. See "e" under Test Instructions. Do not use after expiration date.

hema-screen™ Developing Solution - Store at room temperature (15°-30°C or 59°-86°F). Do not refrigerate or freeze. Protect from heat, humidity and light. When stored as recommended, solution will remain stable for at least three years from date of manufacture. Keep tightly capped when not in use. **PRECAUTION:** Developing solution is flammable. Wash immediately with water if skin or eyes are contacted. Do not ingest. Do not use after expiration date.

For in vitro diagnostic use. Do not substitute reagents from kits from other manufacturers. You may interchange slides & reagent from Immunostics hema-screen™ kits as long as they are within the expiration date. Patient specimens and all materials coming into contact with them should be handled as if capable of transmitting infections and disposed of with proper precautions.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

The hema-screen™ test requires only a small fecal specimen. The specimen is applied to the guaiac paper of the hema-screen™ slide as a thin smear using the applicator stick provided. The tests may be prepared and developed immediately, or prepared and stored at room temperature, protected from heat and light for up to twenty one (21) days before developing. Keep testing area, hands, etc. clean and free from blood to avoid false positive results.

It is recommended for screening of asymptomatic persons that stool smears for testing be collected from at least three consecutive bowel movements (i.e. hema-screen™ Patient Packs) since bleeding from gastrointestinal lesions may be intermittent. Gregor^{3,7} recommends two samples per stool, with each test site (I, II) prepared from a different part of each day's stool to increase the probability of detecting occult blood in each stool.

INTERFERING SUBSTANCES

There are some oral medications such as aspirin, corticosteroids, reserpine, phenylbutazone, indomethacin, etc. that can cause gastrointestinal irritation and occult bleeding in some patients. Ascorbic acid (Vitamin C) taken in units greater than 250 mg per day may cause false negative results. Iron or preparations containing Iron may cause false positive results¹⁵. Two days prior to and during the test period such medications should be avoided. Patients with bleeding from other conditions such as hemorrhoids, dental work, constipation or menstrual bleeding should not be tested while such conditions are present. Do not collect a specimen if patient is using rectal preparations. The patient's physician should be consulted when discontinuing prescription medications.

PATIENT PREPARATION

For three days (3) before and during the stool collection period, avoid red meats (Beef, Lamb and Liver). Eat a well balanced diet including fiber such as bran cereals, fruits and vegetables. Raw fruits and vegetables which contain peroxidase-like substances (turnips, broccoli, horseradish, cauliflower, cantaloupe, parsnips, red radish etc.) should be avoided during the test period.¹⁴

A diet such as this helps reduce the number of false positive test results and at the same time provides roughage to help uncover silent lesions which may bleed only intermittently. If any of the above foods are known to cause patient discomfort, patient should be instructed not to eat them or to make appropriate substitutions. In an initial three-test series, the patient may disregard the recommended diet. If patient has one or more positive tests, then he or she should be placed on the above suggested diet and retested for another three-test series. However it should be remembered that bleeding may be intermittent and no positive test result should be disregarded.

TEST INSTRUCTIONS

hema-screen™ Slides:

- a. Slide Identification: (to be performed by the patient) Identify each slide with patient's name, phone number, address and date.
- b. Slide Preparation: (to be performed by the patient)
 1. With applicator, apply very thin smear of stool inside Area where indicated with Roman numeral I. Using the same applicator repeat from a different portion of the stool for Area II. Discard the applicator in the trash after use.
 2. Repeat the procedure for a total of three bowel movements.
 3. Bring or send slides to a doctor immediately after preparing last test.
- c. Slide Development: (to be performed by the laboratory)
 1. On back of slide, open perforated section, marked 1 and 2.
 2. Apply two or more drops of hema-screen™ Developing Solution to exposed test paper.
 3. Read results between 30 - 60 seconds.
 - a) Any trace of blue is positive for occult blood.
 - b) No indication of blue is negative.
 - d. Performance Standards Development: Performance standards on the slides allow for testing the function and stability of the slides and developer. A positive (+) performance standard and a negative (-) performance standard are located under the perforated flap on the back of the slide. It is important that the Performance Standards be developed after specimens to avoid interference or prejudice of test interpretation.
 1. Add 1 drop of developer directly onto control area (between positive (+) and negative (-) performance standards.)
 2. Read results within 30 seconds. The positive standard contains a hemoglobin derived catalyst. After addition of the developer, a blue color should appear within 30 seconds. The negative standard should not show a blue color. If the standards do not react as expected, the test results should be regarded as invalid. Contact Immunostics, Inc. for assistance.
- e. A light blue discoloration may be noticed on the guaiac test paper, which does not affect the accuracy or test performance when interpreted according to the recommended procedure. When developer is added directly over the fecal smear on a discolored slide, the blue color migrates outward and forms a blue ring at the edge of the wetted area, this blue ring would be considered a negative result. The guaiac paper around the fecal smear will remain off white in color. Any blue on the edge of the fecal smear would be considered a positive result. Proper storage will prevent discoloration.

SPECIAL FINDINGS

Rarely, the fecal sample may appear greenish in color even before the developer is added or a green coloration may be observed after the addition of the developer. Sometimes this greenish color is "washed out" by the developer and moves to the periphery of the test area, such observations should be considered negative results. In contrast when the greenish color does not wash out to the periphery, and remains fixed to its location, such findings should be considered positive results. Green colors are likely to be due to the presence of bile. Bile alone would not remain fixed in the fecal sample and the developer would wash the color out to the periphery of the test area. However, the fecal sample may contain occult blood in addition to bile. In such cases, the green color that may develop will not wash out of its location on the fecal sample.

EXPECTED VALUES

IT IS IMPORTANT THAT THE hema-screen™ SLIDES BE READ BETWEEN THIRTY (30) AND SIXTY (60) SECONDS AFTER hema-screen™ DEVELOPING SOLUTION HAS BEEN APPLIED THE COLOR REACTION WILL TEND TO FADE AFTER TWO TO FOUR MINUTES. Neither the intensity nor the shade of blue as seen in the positive performance standard should be regarded as an indication of what the blue from a positive fecal specimen should look like. ANY TRACE OF BLUE WITHIN THE THIRTY (30) TO SIXTY