

CRYPTO-GIARDIA-ENTAMOEBIA MonlabTest® CE

MO-076005 20 TESTS IVD

Immunochromatographic test for the detection of and *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* antigens in human stool samples

For *in vitro* use only. Store at 2 - 30°C.

INTRODUCTION

Intended use

A single-step qualitative immunochromatographic test with separate lines to detect and help diagnose infection caused by the parasites, *Cryptosporidium spp.*, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* based on their antigens in human stools.

The Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest results should be evaluated by a doctor in combination with other clinical information about the patient. They should not be used as the only criterion for diagnosing the infection.

This test is exclusively for *in vitro* diagnostic use.

This test is for professional use. This is not a diagnostic test for use at the patient care location. This is not a self-diagnostic test.

General information

The Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest qualitative immunochromatographic assay is a procedure for detecting *Cryptosporidium spp.*, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* in human stools on separate lines. A positive signal on any of the positive test lines gives a good indication that an infection caused by *Cryptosporidium spp.*, *Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica* may be present.

Intended test population

The Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest is intended for use on the general population. However, in the case of *Cryptosporidium* and *Giardia*, a significant number of samples can come from children, given that *Cryptosporidium* is considered the second main cause of gastroenteritis among children, behind Rotavirus, and *Giardia lamblia* is highly prevalent among children.

Disease incidence among the population

Cryptosporidiosis is an endemic disease worldwide, occurring much more frequently in developing countries. Its prevalence among patients with gastrointestinal symptoms is 1-4% in Europe and North America, and 3-20% in Africa, Asia, Australia, Central America, and South America. According to the report published by the ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) based on 2017 data, the reporting rate was 3.2 confirmed cases per 100,000 persons in the European Union and countries of the European Economic Area. The reporting rate was higher for children aged 0 to 4 years old with 12.5 cases per 100,000 persons.

When it comes to *Giardia lamblia*, giardiasis is a highly prevalent parasitism occurring worldwide, particularly among children. Worldwide, the estimated frequency is 200,000,000 infected people, 500,000 of which become ill. It is a cause of diarrhoea for up to 20% of cases in developing countries, but only for 3-7% in developed countries. The report published by the ECDC based on 2017 data indicates that there were 19,437 confirmed giardiasis cases and the reporting rate was 5.5 confirmed cases per 100,000 persons. The reporting rate was higher for children aged 0 to 4 years old, with 17.6 cases per 100,000 persons for boys and 14.9 cases per 100,000 persons for girls. The reporting rate reduced with age and was lowest among people ≥ 65 years old.

When it comes to *Entamoeba histolytica*, approximately 50 million cases of invasive disease from *E. histolytica* occur each year worldwide, resulting in up to 100,000 deaths. This is only the tip of the iceberg as only 10%-20% of infected people are symptomatic. The incidence of amebiasis is greater in developing countries due to deficient sanitation and socio-economic conditions, but with the increase in travel and emigration to developed countries, the infection is becoming more common in non-endemic regions.

The overall prevalence of amebiasis in the United States of America is approximately 4%. Infection by the non-pathogenic and morphologically identical species, *Entamoeba dispar*, is 10 times more common than infection by *E. histolytica*. Furthermore, only 10% of infections by *E. histolytica* cause invasive disease. Therefore, only 1% of people with positive results for Entamoeba via microscopy develop symptomatic amebiasis.

Characteristics of *Cryptosporidium spp.* and its infection

Cryptosporidium spp. is a gastrointestinal protozoan parasite that infects humans and animals, causing a disease known as intestinal, tracheal and pulmonary cryptosporidiosis. *Cryptosporidium parvum* belongs to the *Cryptosporidium* genus, and along with *Cryptosporidium hominis*, causes over 90% of human cryptosporidiosis infections. Its most common route of transmission is the ingestion of cysts present in water or food contaminated with human faecal matter.

Cryptosporidium has a very short life cycle and each generation can develop and mature in 12-24 hours. Along with its self-infecting nature, this means the intestinal tract becomes infected by a large number of parasites in just a few days. It is usually a short, acute infection, although it can also be asymptomatic. Diarrhoea, weight loss, and abdominal cramps are the clinical symptoms of the disease, which can be more serious among children or immunosuppressed patients, as the diarrhoea episodes are worse and can lead to electrolyte imbalance.

Pulmonary and tracheal cryptosporidiosis is associated with coughing and fever, often accompanied by intestinal changes. These symptoms generally develop 4-6 days after infection, although they can appear at any moment within 2-10 days.

Characteristics of *Giardia lamblia* and its infection

Giardia lamblia is the gastrointestinal parasite that causes giardiasis in humans, with a clinical condition that varies from asymptomatic patient carriers to cases of acute or long-lasting diarrhoea, particularly among children.

The disease's most common route of transmission involves the ingestion of cysts present in water or food contaminated with faecal matter.

Symptoms appear 1-3 weeks after contagion, following an incubation period of approximately 8 days. The most frequent presentation is characterised by diarrhoea, weight loss, colic-type abdominal pain, and arrested growth and development. Symptom onset may be sudden or gradual; the disease can be self-limited or produce severe diarrhoea with poor intestinal absorption. Gastrointestinal function changes are common in children with persistent symptoms.

Characteristics of *Entamoeba histolytica* and its infection

Entamoeba histolytica is the agent that causes dysentery and amebiasis. This parasitic disease is the third cause of mortality among humans after malaria and schistosomiasis, and is estimated to be responsible for 50,000-100,000 deaths a year.

It is usually transmitted by the ingestion of cysts present in food or water contaminated with infected faecal material. The disease can manifest as an acute, chronic, or asymptomatic infection. The symptoms of amebiasis are both intermittent and mild among most infected human beings (different gastrointestinal disorders, including diarrhoea, colitis). In more severe cases, dysentery is the most common manifestation of invasive intestinal amebiasis. Extra-intestinal amebiasis occurs in a small percentage of infected adults, with liver abscesses the most common location.

THE BASIS OR BASIC PRINCIPLES OF THE TEST

The Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest is an immunochromatographic test that uses a combination of:

- Blue latex particles conjugated to a specific antibody that targets *Cryptosporidium spp.* antigens and works in conjunction with a specific antibody for *Cryptosporidium spp.* located in the membrane (position 1 on the housing).
- Red latex particles conjugated to specific antibodies that target *Giardia lamblia* antigens and work in conjunction with specific antibodies for *Giardia lamblia* located in the membrane (position 2 on the housing).
- Green latex particles conjugated to specific antibodies that target *Entamoeba histolytica* antigens and work in conjunction with specific antibodies for *Entamoeba histolytica* located in the membrane (position 3 on the housing).
- Purple latex particles conjugated to an antigen recognised by a specific antibody for said antigen bound to the membrane, comprising the so-called test control line (position C on the housing).

This test first involves treating the sample with the sample dilution buffer (included in the kit) to extract the parasites. Once extracted, it simply requires adding a specific volume of the supernatant to the reagent strip and waiting for 10 minutes.

The coloured particles migrate when the extracted sample flows along the strip. In the event of a positive sample, the antibodies present in the particles will react with the parasite's antigens, forming a particle-antigen complex, which will also be retained in the membrane by other parasite-specific antibodies.

Different coloured lines will appear depending on the parasite content in the sample. These lines are used to interpret the result after 10 minutes of incubation at room temperature (see Fig. 1).

MATERIALS INCLUDED IN THE KIT

- 20 Reaction devices,
- 1 Sample dilution buffer (30 mL),
- Instructions for use.

MATERIALS NOT INCLUDED IN THE KIT

- Suitable devices for sampling stools,
- Vortex,
- Test tubes/microtubes,
- Graduated pipettes,
- Chronometer.

PRECAUTIONS

- The patient samples (stools) must be handled with care as they may contain infectious agents. Disposable gloves must be worn throughout the process.
- The sample dilution buffer contains 0.095% sodium azide as an anti-microbial agent. Avoid direct contact with skin and mucous membranes. Dispose of appropriately. Do not use the buffer if there are any signs of contamination or precipitation. The sample dilution buffer contains animal-sourced material (albumins). All animal-sourced material used are trade references and come with their relevant certificate stating they are not infectious.
- Do not eat, drink, smoke or prepare food in the area where reagents and samples are handled.
- On completing the task, clean all work surfaces with soap and water, and disinfect them with a suitable solution. Lastly, dispose of the protective gloves correctly and wash your hands with soap and water, rubbing them well.
- Do not exchange components from kits with different batch numbers.
- If the test is stored refrigerated, allow all the kit's components and the stool samples to reach room temperature, as cold reagents and/or samples can reduce the test's functionality. Allowing 20 to 30 minutes to reach room temperature is recommended.
- Only use the reagents *in vitro*.
- The immunochromatographic strips are single use. One strip is used for each sample requiring analysis.
- Do not use the kit components after their expiry dates.
- If the outer box is damaged, the product can still be used providing none of the components have been damaged.
- Throw the test away if the primary packaging is either broken or impaired.
- Remove the strip or device from the aluminium bag when the test is going to be performed to avoid unnecessary excessive exposure of the product to any potentially damaging environmental factors.
- Adding the correct volume of extracted sample to the reaction device is very important. If lower than indicated, the chromatography may not develop because insufficient sample reached the reaction zones; excessive volume could spill inside the device and the chromatography may not develop correctly.
- Please dispose of the used product in accordance with current legislation.
- Do not use the test if there are any coloured lines in the results zone prior to use.



- Sampling a suitable amount is very important: around **50 mg** if they are **solid or soft samples** (a small pellet around 3 mm in diameter) and **100 µl** if they are **liquid samples**; these amounts are extracted in 1 mL of the sample dilution buffer included with the kit. Too much sample in relation to the amount of added buffer prevents the chromatography from developing correctly. This is especially critical with solid or soft samples, as sampling the correct amount is not that simple.
Too less sample in relation to the amount of added buffer can affect the test result. This is especially critical for samples with a low concentration of analyte.
- Do not discard the kit's outer box until all the content has been used. The box contains essential information about the product's CE marking and the batch number.
- Any serious incident involving the product must be reported to the manufacturer and the relevant authority in the member state where the user and/or patient are located.

STORAGE

The Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest product can be stored at any temperature from +2 to +30 °C.
The use-by date of each component is printed on the aluminium wrappers.
The reagent strips must be used once the protective packaging has been opened after reaching room temperature (if stored refrigerated).
The product maintains the claimed stability once open.

SAMPLES

- This test is designed to analyse human stool samples. Collecting the stool sample as soon as symptoms appear is recommended.
- Do not use samples that have been collected in transport media, or those with added preservative agents (such as formalin, SAF, PVA or similar) or enrichment media, as their presence could interfere with correct performance of the test.
- Analysing **fresh, untreated samples** is recommended. If they need to be kept for a certain amount of time, they can be stored in a refrigerator (+2 to 8°C) for 1 or 2 days. For longer time periods, they should be frozen to -20°C, bearing in mind that some samples may lose their immunoreactivity after freezing.
- Ensure any frozen samples have fully thawed at room temperature before analysing them.
- Avoid freeze-thaw cycles, as this could alter the immunological recognition of the parasites.

PREPARING STOOL SAMPLES

General note: use disposable gloves throughout the test as infectious samples are being handled. Once the work is concluded, do not forget to comply with the hygiene procedures detailed in point 4 of the "Precautions" section.

- Homogenise the sample beforehand to make it as representative as possible.
- For **liquid or semi-liquid stools**, use a pipette to add **100 µl** of sample to a labelled 1.5 mL microtube. If the **sample is solid**, sample approximately **50 mg** (a small pellet around 3 mm in diameter) and add it to a labelled 1.5 mL microtube.
- Add **1 mL of the sample diluent** to the aforementioned 1.5 mL microtube (or the volume required to ensure a proportion of 100 µl (~50 mg) of sample in 1 mL of dilution buffer).
- Agitate in the vortex for 30 seconds or the time required to ensure the sample suspends completely in the buffer. If a vortex is not available, agitate vigorously by hand to ensure the stool sample suspends in the buffer.
- Centrifuge the 1.5 mL microtubes for 5 minutes at 700 xg (approximately 3,000 rpm) in order to sediment the solid particles, using a small centrifuge adapted to these microtubes. If a suitable centrifuge is unavailable, please wait 3-5 minutes until the solid particles have settled to the bottom of the tube. However, the test works best when using a clear sample solution extracted using a centrifuge.
- Once extracted, stools should be analysed immediately or within 6 hours of extraction using the Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest (see the "Procedure" section).

PROCEDURE

Once the samples have been prepared as indicated above, proceed as follows:

- Remove the reaction device from the aluminium bag. Discard the small desiccant sachet as its sole purpose is to keep the test dry and it is not used to perform the test.
- Use a graduated pipette to sample **125 µl of the supernatant** of the sample and add it to the sample area of the reaction device (the circular window indicated by an arrow). Do not add solid particles with the liquid.
- Wait **10 minutes**, then read and interpret the result.

READING THE RESULTS

Five images in Fig. 1 show some of the possible results with the Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest, with combinations possible should the patient present co-infections with the detected parasites.

Four different coloured lines can be seen:

- An upper purple line: this is the control line that indicates that the test functions correctly.
- A middle green line: this indicates that *Entamoeba histolytica* is present in the sample.
- A middle red line: this indicates *Giardia lamblia* is present in the sample.
- A lower blue line: this indicates that *Cryptosporidium spp.* is present in the sample.

The purple control line must always appear. If any of the other three coloured lines also appear, this indicates that *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and/or *Cryptosporidium spp.* is/are present in the sample.

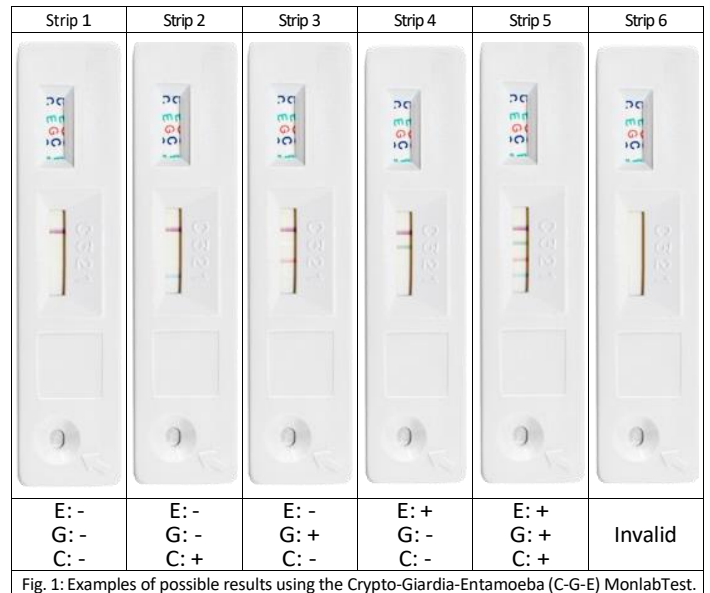


Fig. 1: Examples of possible results using the Crypto-Giardia-Entamoeba (C-G-E) MonlabTest.

- Strip 1: NEGATIVE result.**

Only a horizontal **PURPLE** line appears on the reaction device (aligned with the letter "C" marked on the housing). This is the control line, which must always appear, as it indicates that the chromatography worked correctly.

- Strips 2-5: POSITIVE results:**

- Strip 2: *Cryptosporidium positivo***

A **PURPLE** (control) line appears aligned with the letter "C" and a **BLUE** line appears below the control line (aligned with the number "1" marked on the housing).

- Strip 3: *Giardia positivo***

A **PURPLE** (control) line appears aligned with the letter "C" and a **RED** line appears below the control line (aligned with the number "2" marked on the housing).

- Strip 4: *Entamoeba positivo***

A **PURPLE** (control) line appears aligned with the letter "C" and a **GREEN** line appears below the control line (aligned with the number "3" marked on the housing).

- Strip 5: *Cryptosporidium positivo + Giardia positivo + Entamoeba positivo***

A **PURPLE** (control) line appears aligned with the letter "C". Directly below, a **GREEN** line appears (aligned with the number "3" marked on the housing), below which a **RED** line appears (aligned with the number "2" marked on the housing), below which a **BLUE** line appears (aligned with the number "1" marked on the housing).

- Strip 6: INVALID results**

The **PURPLE** control line does not appear, the control line colour is clearly altered, or different colours appear on the positive lines (compared to those previously indicated). This is an indication that the test has not worked correctly. This may be due to any of the following reasons:

- some of the reagents have deteriorated or the test has expired.
- the sample was not prepared in accordance with the instructions for use.
- the sample has a high blood content.

Repeating the test using a new strip in the event of an invalid result is recommended, strictly adhering to the instructions for use described in this manual. In the case of samples with blood, using an alternative technique is advised, as the instability problem does not usually depend on the strip used, but on the matrix of the sample itself.

Any line that appears after 10 minutes will have no diagnostic value due to the nature of the sample.

NOTE: a doctor should make the final and definitive diagnosis. This test only detects *Cryptosporidium spp.*, *Giardia lamblia*, and *Entamoeba histolytica* in a sample. It does not constitute an argument to state that a person is infected by any of these parasites.

QUALITY CONTROL

The test is invalid if a **PURPLE** line does not appear, either because the test was not performed properly or because the reagents have deteriorated. In this case, repeat the test, strictly following the operating protocol detailed in these instructions for use.

WARNING: including our controls with a known result is recommended to ensure that correct data is obtained.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- The Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest is for differentiating and identifying *Cryptosporidium spp.*, *Giardia lamblia*, and *Entamoeba histolytica*, detecting their presence in human stools as long as the parasites' load is equal to or above the assay's limit of detection.
Detecting other complications such as respiratory cryptosporidiosis described among immunosuppressed patients, most of whom have advanced AIDS/HIV disease, or extraintestinal amebiasis in the case of *Entamoeba histolytica*, is not the intended use of the test.
- The test is qualitative, not quantitative, although the intensity of the positive lines does relate to the amount of parasites detectable in the stool sample.
- The test has shown good correlation with other techniques such as microscopy and PCR (in the case of *E. histolytica* detection) after analysing a large amount of stool samples.



- Using the correct amount of sample is important. A defective sample may lead to very weak positive results. In this case, the test should be repeated with more sample. On the other hand, excess sample could cause the test to develop very slowly and even prevent it from developing correctly (control lines not visible). In this case, the test should be repeated with a smaller amount of sample (see the "Preparing stool samples" section).
- A negative result does not rule out the possibility of infection by *Cryptosporidium spp.*, *Giardia lamblia*, and *Entamoeba histolytica*. Not detecting these parasites may result from factors such as sampling during an unsuitable phase of the disease (parasite excretion in stools is usually intermittent); incorrect storage of the sample; unsuitable transportation of the sample, and so on.
- A positive result does not rule out the presence of other pathogenic agents, which may cause a co-infection of any of these three parasites with other micro-organisms. In any case, co-infections can only be clarified by differential diagnosis.
- The test results must be interpreted alongside the available data from epidemiological studies, the patient's clinical evaluation, and other diagnostic procedures.
- Analysing some samples can produce undefined coloured lines, caused by negative samples in most cases. The test should be repeated if undefined coloured lines appear. If the same result is obtained again, performing the analysis using another analytical method is suggested.
- Given the similarity between *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*, some cross-reactivity has been found to occur with the non-pathogenic species, *E. dispar* when it is present in the sample at concentrations equal to or higher than 1.56×10^5 cysts/mL.
- Test results should be interpreted in conjunction with information available from epidemiological studies, patient clinical evaluation and other diagnostic procedures.
- Test results to verify the eradication efficacy (test of cure) have not been established.

DETECTION CAPABILITY

When using oocysts of *Cryptosporidium parvum* inactivated by gamma irradiation (batch B971-627) from Biopoint (Biomérieux) as a reference standard, the detection capability of the Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest for *Cryptosporidium* in faecal matter is established at 2.25×10^5 oocysts/mL. Using the supernatant collected after the first washing of faecal matter from mice experimentally infected with *Cryptosporidium parvum* from R-Biopharm as a reference, the detection capability of the Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest in the sample dilution buffer for *Cryptosporidium* is established at 5.63×10^4 cells/mL. Using cultures of *Giardia lamblia* (ATCC 30957) in their two possible biological forms (cysts and trophozoites), the detection capability of the Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest in a faecal matter for *Giardia* is established as 3120 cysts/mL and 6.09×10^4 trophozoites/mL. Using the supernatant of a quantified culture of *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS from R-Biopharm, the detection capability of the Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest for *E. histolytica* in faecal matter is established as 913 trophozoites/mL.

ANALYTICAL SPECIFICITY

The monoclonal antibodies used to detect *Cryptosporidium spp.*, *Giardia lamblia*, and *Entamoeba histolytica* specifically recognise antigens from these parasites. However, antibodies that target *E. histolytica* have been detected to present some cross-reactivity with the species, *Entamoeba dispar*. No cross-reactions with other antigens and/or micro-organisms present in stool samples have been detected. See the cross-reactivity section.

DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

Internal evaluation

The study included the analysis of 114 samples for *Cryptosporidium spp.* and 113 samples for *Giardia lamblia* characterised using microscopy as a reference technique. For *Entamoeba histolytica*, a total of 104 samples characterised using PCR as a reference technique were analysed, given that when using microscopy, *E. histolytica* is morphologically indistinguishable from the non-pathogenic species, *E. dispar* and *E. moshkovskii*.

Microscopy (*Cryptosporidium y Giardia*)

<i>Cryptosporidium spp.</i>	Microscopy	
	Positive	Negative
Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest	26	0
	0	88

Sensitivity Concordance = $26/(26+0) = >99,9\%$

Specificity Concordance = $88/(88+0) = >99,9\%$

<i>Giardia lamblia</i>	Microscopy	
	Positive	Negative
Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest	54	0
	1	58

Sensitivity Concordance = $54/(54+1) = 98,2\%$

Specificity Concordance = $58/(58+0) = >99,9\%$

The false negative divergent sample was analysed using the R-Biopharm ELISA RIDASCREEN® Giardia, which also provided a negative result, suggesting that it may be a positive sample with a very low concentration in the parasite and it is below the limit of sensitivity for the evaluated immunoassays.

PCR (*Entamoeba histolytica*)

<i>Entamoeba histolytica</i>	PCR	
	Positive	Negative
Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest	9	4
	0	91

Sensitivity Concordance = $9/(9+0) = >99,9\%$

Specificity Concordance = $91/(91+4) = 95,8\%$

The 4 false positive divergent samples were analysed using PCR on *E. dispar*, giving a negative result, ruling out that the false positive was caused by a cross reaction with this species.

REPEATABILITY

INTRA-ASSAY PRECISION:

Five replicates of a series of 1/2 dilutions of internal standards (sensitivity curve), along with real samples established as NC ("negative sample"), LPC ("weak positive sample"), and PC ("positive sample") for each analyte detected by the test, were measured on the same day by the same person.

No differences between the replicates of each analyte were detected, or with either the standard or the samples, so the repetitiveness was 100%.

REPRODUCIBILITY

INTER-DAY PRECISION:

The same batch of Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest was used to measure a sensitivity curve and real samples established as NC ("negative sample"), LPC ("weak positive sample"), and PC ("positive sample") for each analyte in duplicate over a five day period spaced out over time. Reproducibility with all analytes was 100% using the standard. For some LPC samples, differences around 1/2 half dilution were observed for Crypto and Entamoeba analytes, while the reproducibility for Giardia was 100%. The reproducibility with the three analytes was 100% for the other samples.

INTER-OPERATOR PRECISION:

Three persons measured a sensitivity curve for each analyte and real samples established as NC ("negative sample"), LPC ("weak positive sample") and PC ("positive sample") for each analyte in triplicate. The observed differences were no superior to a 1/2 dilution with the standard in any of the cases, and the differences were equal to or less than 1/2 half dilution with the real samples.

INTER-BATCH PRECISION:

Three different batches of the Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest were evaluated in parallel by analysing the usual sensitivity curves for this test and real samples established as NC ("negative control"), LPC ("low positive control") y PC ("positive control") for each analyte. The analysis was performed by one person on the same day. The biggest observed differences were equal to less than 1/2 half dilution to the standard, and the same results were obtained using real samples, providing evidence for high inter-batch precision for the test.

THE HOOK OR PROZONE EFFECT

There is evidence that the Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest:

- Does not present a Hook effect for Crypto until *Cryptosporidium parvum* concentrations of 7.2×10^6 oocysts/mL in faecal matter when using oocysts of *Cryptosporidium parvum* inactivated by gamma irradiation (batch B971-627) from Biopoint (Biomérieux) as a reference standard.
- A Hook effect was not detected for Giardia until *Giardia lamblia* concentrations of 1.6×10^6 cysts/mL in faecal matter using a quantified culture grown from the strain ATCC 30957 as standard.
- Does not present a Hook effect for Entamoeba until *Entamoeba histolytica* concentrations of 2.3×10^6 trophozoites/mL in faecal matter, when using the supernatant of a quantified culture of *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS from R-Biopharm as standard, albeit that very high concentrations of 9.3×10^6 trophozoites/mL slightly lower the signal intensity.

INTERFERING SUBSTANCES

At the concentrations indicated in the table, the following substances did not affect the test results when added to extracted stool samples (negative and weak positive in the analyte):

Interfering substances	Concentration	Interfering substances	Concentration
Loperamide (Fortasec®)	6.25 µg/mL	Omeprazole	7.8 µg/mL
Racecadotril (Tiorfan®)	0.12 mg/mL	Lansoprazole	23.5 µg/mL
Gelatin tannate (Tanagel)	1.17 mg/mL	Ibuprofen	0.94 mg/mL
Diosmectite (Dialiv)	7 mg/mL	Acetylsalicylic acid	1.6 mg/mL
Ultra levura (<i>Saccharomyces boulardii</i> CNM I-745)	0.2 mg/mL	Paracetamol	1.6 mg/mL
Infloran (<i>Lactobacillus acidophilus</i> and <i>Lactobacillus bifidus</i>)	1.17×10^6 cell/mL	Palmitic/ stearic acid	40 % (w/w)
Metronidazole	0.78 mg/mL	Mucin	3.5 % (w/w)
Vancomycin	2.34 mg/mL	Barium sulphate	2.9 mg/mL
Bismuth subsalicylate (Peptobismol®)	5 % (v/v)	Blood	40 % (v/v)
Almagate (Almax®)	3.1 mg/mL		



CROSS-REACTIVITY

The Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest was tested against different organisms with no cross-reactivity occurring:

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *E.coli* 0157:H7, *E.coli* ST131-025b, *E.coli* ST131, *E.coli* O6, *Salmonella typhimorium*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* present at a concentration of 1×10^7 cells/mL; *Entamoeba dispar* and *H. pylori* CPY6271 of unknown concentration and sourced from BEI Resources diluted ten times in faecal matter; and the viruses Rotavirus A and Adenovirus 51 at $TCID_{50} \geq 5 \times 10^2$ /mL, and Astrovirus Type 1 at $TCID_{50} = 2.8 \times 10^6$ /mL and Norovirus 1 (clon W3) a $TCID_{50} = 3,3 \times 10^6$ /mL.

Cross-reactivity with *Entamoeba dispar* at concentrations equal to or above 1.56×10^5 cysts/mL was observed on the *Entamoeba histolytica* test line.

MODIFICATIONS COMPARED TO THE PREVIOUS VERSION OF THIS DOCUMENT

The structure of the general information provided at the beginning of the document is improved, breaking down the different sections in order to be coherent with the IVDR requirements.










The components of the kit are better identified.

Regarding the test performance parameters, modifications have been introduced in the following sections: "Precautions", "Storage", "Samples", "Preparing stool samples", "Reading the results", "Limitations of the procedure", "Detection capability", "Analytical specificity", "Diagnostic sensitivity and specificity", "Repeatability", "Reproducibility", "Hook or prozone effect", formerly "Hook effect", "Interfering substances" and "Cross-reactivity".

REFERENCES

- Goñi, P. *et al.*, Evaluation of an immunochromatographic dip strip test for simultaneous detection of *Cryptosporidium* spp, *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba histolytica* antigens in human faecal samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 31(8):2077-82 (2012).
- Roka, M. *et al.*, Prevalence of intestinal parasites in HIV-positive patients on the island of Bioko, Equatorial Guinea: Its relation to sanitary conditions and socioeconomic factors. *Sci Total Environ.* 432:404-11 (2012).
- Weitzel, T. *et al.*, Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. *Clin Microbiol Infect.* 12:656-659 (2006).
- Lake, I.R. *et al.*, Case-control study of environmental and social factors influencing cryptosporidiosis. *Eur J Epidemiol.* 22:805-811 (2007).
- Khalakina, A. *et al.*, Is drinking water a risk factor for endemic cryptosporidiosis? A case-control study in the immunocompetent general population of the San Francisco Bay Area. *BMC Public Health.* 3: 1471-2458 (2003).
- Cacciò, S.M. *et al.*, Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* 21: 430-437 (2005).
- Chalmers RM, *et al.*, Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends Parasitol;* 29(5):237-251(2013).
- Nygard, K. *et al.*, A large community outbreak of waterborne giardiasis-delayed detection in a non- endemic urban area. *BMC Public Health.* 6: 141 (2006).
- Monis, P.T., *et al.*, *Cryptosporidium* and *Giardia*- zoonoses: fact or fiction? *Infect Genet. Evol.* 3: 233- 244 (2003).
- Ekdahl, K., *et al.*, Imported giardiasis: impact of international travel, immigration, and adoption. *Am. J. Trop. Med.* 72: 825-830 (2005).
- Hooshyar H., *et al.*, *Giardia lamblia* infection: review of current diagnostic strategies, *Gastroenterol Hepatol Bed Bench;*12(1):3-12 (2019).
- Rosoff JD, *et al.*, Isolation and identification of a *Giardia lamblia*-specific stool antigen (GSA 65) useful in coprodiagnosis of giardiasis. *J Clin Microbiol;* 23(5):905-910 (1986).
- Van den Bossche D, *et al.*, Comparison of four rapid diagnostic tests, ELISA, microscopy and PCR for the detection of *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp, and *Entamoeba histolytica* in feces. *J Microbiol Methods;*110:78-84 (2015).
- Kantor M, *et al.*, *Entamoeba histolytica*: Updates in Clinical Manifestation, Pathogenesis, and Vaccine Development. *Can J Gastroenterol Hepatol.* Dec 2 (2018).
- Dolabella SS, *et al.*, Amoebic liver abscess production by *Entamoeba dispar*. *Ann Hepatol;* 11(1):107-117 (2012).
- Ungar, B. L. P. *et al.*, Use of a monoclonal antibody in an enzyme immunoassay for the detection of *Entamoeba histolytica* in fecal specimens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34: 465-472 (1985).
- Strachan, W. D. *et al.*, Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *The Lancet* 12: 561 - 563 (1988).
- Yau, Y. C. W. *et al.*, Development of monoclonal antibodies which specifically recognise *Entamoeba histolytica* in preserved stool samples. 39: 716-719 (2001).
- Braga, L.L. Seropositivity for intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in Northeastern Brazil. 36: 3044-3045 (1998).
- Petri Jr. W.A., *et al.*, Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. 58: 1802-1806 (1990).

SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS

	Manufactured by		For <i>in vitro</i> diagnostic use
	Contains sufficient for <n> tests		Please read pack insert
	Catalogue number		Store at
	Lot number		Expiry date
	This product fulfils the requirements of Directive 98/79/EC on <i>in vitro</i> diagnostic medical devices		



CRYPTO-GIARDIA-ENTAMOEBIA MonlabTest® 
MO-076005 20 TESTS 

Test inmunocromatográfico en un solo paso para la detección de antígenos de *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* en heces humanas

Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*. Conservar a 2 - 30°C.

INTRODUCCIÓN

Intención de uso

Test inmunocromatográfico en un solo paso para la ayuda al diagnóstico de la infección causada por los parásitos *Cryptosporidium spp.*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* mediante la detección cualitativa, en bandas independientes, de sus antígenos en heces humanas.

Los resultados obtenidos con Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest deben ser evaluados por el médico clínico en combinación con otra información clínica disponible del paciente. No deben usarse como el único criterio para diagnosticar la infección.

Esta prueba se usa exclusivamente para diagnóstico *in vitro*.

Es un test para uso por profesionales. No es una prueba diagnóstica en el lugar de asistencia al paciente. No es un test de uso de autodiagnóstico.

Información general

El inmunoensayo cromatográfico Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest es un procedimiento para la detección cualitativa, en bandas independientes, de *Cryptosporidium spp.*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* en heces humanas. Una señal positiva en cualquiera de las bandas positivas del test proporciona un buen indicio de que podamos estar ante una infección causada por *Cryptosporidium spp.*, *Giardia lamblia* y/o *Entamoeba histolytica*.

Población a la que está destinada la prueba

Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest va dirigido a toda la población en general. Sin embargo, en el caso de *Cryptosporidium* y *Giardia*, un número importante de las muestras pueden proceder de la población infantil, ya que *Cryptosporidium* se considera la segunda causa principal de gastroenteritis en niños, después de Rotavirus, y *Giardia lamblia* muestra una elevada prevalencia en niños.

Incidencia en la población de la enfermedad

La cryptosporidiosis es una enfermedad endémica extendida por todo el mundo, siendo mucho más frecuente en desarrollo. Su prevalencia en pacientes con síntomas gastrointestinales es del 1-4% en Europa y Norteamérica y entre el 3-20% en África, Asia, Australia, Centroamérica y Sudamérica. Según el informe publicado por el ECDC (Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades), basado en los datos de 2017, la tasa de notificación fue de 3,2 casos confirmados por 100.000 habitantes en la Unión Europea y en Países del Área Europea Económica. Los niños entre 0 y 4 años mostraron la mayor tasa de notificación con 12,5 casos por 100.000 habitantes.

En el caso de *Giardia lamblia*, la giardiasis es un parasitismo de amplia dispersión mundial y de elevada prevalencia, sobre todo entre la población infantil. A nivel mundial se ha estimado una frecuencia de 200.000.000 de individuos infectados, de los cuales 500.000 sufren enfermedad. Es la causa de diarrea en hasta un 20% de los casos en países en vías de desarrollo, pero sólo de un 3-7% en países desarrollados. El informe publicado por el ECDC basado en datos de 2017, indica que se confirmaron 19.437 casos de giardiasis y la tasa de notificación fue de 5,5 casos confirmados por 100.000 habitantes. Los niños entre 0 y 4 años mostraron la mayor tasa de notificación con 17,6 casos en niños por 100.000 habitantes y 14,9 casos en niñas por 100.000 habitantes. La tasa de notificación disminuyó con la edad y fue más baja en personas ≥ 65 años de edad.

Con respecto a *Entamoeba histolytica*, en todo el mundo se producen aproximadamente 50 millones de casos de enfermedad invasiva por *E. histolytica* cada año, resultando en hasta 100.000 muertes. Esto representa la punta del iceberg porque solo el 10%-20% de las personas infectadas son sintomáticas. La incidencia de la amebiasis es mayor en los países en desarrollo debido a un saneamiento deficiente y a las condiciones socio-económicas, pero con el aumento de los viajes y la emigración a los países desarrollados, la infección se está volviendo más común en zonas no endémicas.

La prevalencia general de la amebiasis en los Estados Unidos es aproximadamente del 4%. La infección por la especie no patógena, y morfológicamente idéntica, *Entamoeba dispar* es 10 veces más común que la infección por *E. histolytica*. Además, solo el 10% de las infecciones por *E. histolytica* causan enfermedad invasiva. Por lo tanto, solo el 1% de las personas con resultados positivos en *Entamoeba* por microscopía desarrollan amebiasis sintomática.

Características de *Cryptosporidium spp.* y su infección

Cryptosporidium spp. es un parásito protozoario gastrointestinal que infecta a humanos y a animales causando una enfermedad conocida como cryptosporidiosis intestinal, traqueal y pulmonar. *Cryptosporidium parvum* pertenece al género *Cryptosporidium* y, junto con *Cryptosporidium hominis* es el causante de más del 90% de las infecciones por cryptosporidiosis humanas.

Su vía de transmisión más frecuente es la ingesta de quistes presentes en agua o comida contaminada con material fecal humano.

El ciclo vital de *Cryptosporidium* es muy rápido y cada generación puede desarrollarse y madurar en 12-24 horas. Esto, junto con su carácter autoinfecticioso, hace que el tracto intestinal sea infectado en pocos días por un gran número de parásitos. Habitualmente es una infección aguda de corta duración, aunque también puede ser asintomática. Diarrea, pérdida de peso y calambres abdominales son síntomas clínicos de la enfermedad que, en niños o pacientes inmunosuprimidos, pueden ser más graves, ya que las diarreas tienen un curso peor y pueden conducir a un desbalance electrolítico.

La cryptosporidiosis pulmonar y traqueal se asocia con tos y fiebre, acompañada a menudo por alteraciones intestinales. Estos síntomas se desarrollan generalmente entre los 4-6 días después de la infección, aunque pueden aparecer en cualquier momento entre los 2-10 días.

Características de *Giardia lamblia* y su infección

Giardia lamblia es el parásito gastrointestinal causante de la giardiasis en humanos, cuyo cuadro clínico varía desde pacientes portadores sin síntomas hasta casos de diarrea aguda o de larga duración, especialmente en los niños.

La ingesta de quistes presentes en agua o comida contaminada con material fecal es la forma más frecuente de transmisión de la enfermedad.

Los síntomas aparecen de 1-3 semanas después del contagio y ocurren tras un período de incubación cercano a los 8 días. La forma de presentación más frecuente se caracteriza por diarrea, pérdida de peso, dolor abdominal tipo cólico y detención del crecimiento y desarrollo. El inicio de los síntomas puede ser abrupto o gradual; la enfermedad puede estar autolimitada o producir un cuadro de diarrea severa con mala absorción intestinal. Son comunes las alteraciones de las funciones digestivas en los niños con síntomas persistentes.

Características de *Entamoeba histolytica* y su infección

Entamoeba histolytica es el agente causante de la disentería y amebiasis. Esta enfermedad parasitaria es la tercera causa de mortalidad en humanos después de la malaria y esquistosomiasis, y se estima que es responsable de entre 50.000-100.000 muertes cada año.

Habitualmente se transmite mediante la ingesta de quistes presentes en comida o agua contaminada con material fecal infectado. La enfermedad puede manifestarse como una infección aguda, crónica o asintomática. En la mayoría de los seres humanos infectados los síntomas de la amebiasis son intermitentes y leves (distintos trastornos gastrointestinales, incluyendo diarrea, colitis). En casos más severos, la disentería es la manifestación más común de la amebiasis intestinal invasiva. La amebiasis extraintestinal sucede en un pequeño porcentaje de adultos infectados, siendo el absceso hepático la localización más común.

FUNDAMENTO O PRINCIPIOS BÁSICOS DEL TEST

El test Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest es un test inmunocromatográfico que emplea una combinación de:

- Partículas de látex azules conjugadas a un anticuerpo específico frente a los antígenos de *Cryptosporidium spp.* que coopera con un anticuerpo específico para *Cryptosporidium spp.* situado en la membrana (posición 1 de la carcasa).
- Partículas de látex rojas conjugadas a anticuerpos específicos frente antígenos de *Giardia lamblia* que cooperan con anticuerpos específicos para *Giardia lamblia* situados en la membrana (posición 2 de la carcasa).
- Partículas de látex verdes conjugadas a anticuerpos específicos frente antígenos de *Entamoeba histolytica* que cooperan con anticuerpos específicos para *Entamoeba histolytica* situados en la membrana (posición 3 de la carcasa).
- Partículas de látex moradas conjugadas a un antígeno reconocido por un anticuerpo específico para dicho antígeno unido a la membrana conformando la llamada banda de control del test (posición C de la carcasa).

En este test la muestra se trata, en primer lugar, con el tampón diluyente de la muestra (incluido en este kit) para conseguir la extracción de los parásitos. Tras la extracción, tan sólo se necesita añadir un volumen determinado de sobrenadante a la tira reactiva y esperar 10 minutos.

Cuando la muestra extraída fluye a través de la tira, las partículas coloreadas migran. En el caso de una muestra positiva, los anticuerpos presentes en las partículas reaccionarán con los antígenos del parásito, formando un complejo partícula-antígeno que, a su vez, será retenido en la membrana por otros anticuerpos específicos para el parásito.

Dependiendo del parásito contenido en la muestra, serán visibles diferentes líneas de color. Estas líneas se usan para interpretar el resultado a los 10 minutos de incubación a temperatura ambiente (ver Fig. 1).

MATERIAL SUMINISTRADO	MATERIAL NECESARIO PERO NO PROPORCIONADO
<ul style="list-style-type: none"> - 20 casetes - 1 tampón de dilución (30 mL) - Instrucciones de uso 	<ul style="list-style-type: none"> - Dispositivos adecuados para la toma de muestra fecal (sólida o líquida). - Vortex o agitador. - Tubos de ensayo/microtubos. - Pipetas graduables. - Cronómetro.

PRECAUCIONES

- Las muestras de los pacientes (heces) deben ser manipuladas con cuidado ya que pueden contener agentes infecciosos. A lo largo de todo el proceso se deben usar guantes desechables.
- El tampón de dilución de la muestra contiene azida de sodio al 0,095% como agente anti-microbiano. 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.
El tampón de dilución de la muestra contiene material de origen animal (albúminas). Todo el material de origen animal utilizado son referencias comerciales y tienen su certificado asociado que evidencia que no son infecciosos.
- No comer, beber, fumar o preparar alimentos en la zona donde se manejan los reactivos y las muestras.
- Una vez finalizada la tarea, limpiar las superficies de trabajo con agua y jabón y terminar desinfectando con una solución adecuada. Por último, eliminar los guantes y lavar las manos con agua y jabón frotándolas bien.
- No intercambiar los componentes de kits con distinto número de lote.
- En el caso de almacenar el test refrigerado, dejar que todos los componentes del kit y las muestras fecales alcancen la temperatura ambiente, pues reactivos y/o muestras frías pueden reducir la funcionalidad del test. Se recomienda esperar de 20 a 30 minutos para alcanzar la temperatura ambiente.
- Utilizar todos los reactivos únicamente *in vitro*.
- Las tiras inmunocromatográficas son de un solo uso. Se utiliza una tira por cada muestra a analizar.



- No usar los componentes del kit después de la fecha de caducidad.
- En caso de rotura de la caja externa, el producto puede ser utilizado si ninguno de los componentes ha sido dañado.
- En caso de rotura o alteración del envasado primario desechar el test.
- Sacar la tira o el dispositivo de la bolsa de aluminio cuando vaya a realizarse el ensayo, para evitar exponer el producto innecesariamente en exceso a factores ambientales que puedan perjudicarlo.
- Es muy importante añadir el volumen correcto de muestra extraída al dispositivo de reacción. Si es inferior al indicado, puede ser que no se realice la cromatografía porque no llegue suficiente muestra a las zonas de reacción; si es superior, el exceso de volumen podría derramarse por el interior del dispositivo y afectar al correcto desarrollo de la cromatografía.
- El producto usado debe desecharse conforme a la legislación vigente.
- No usar el test si aparece alguna línea de color en la zona de resultados antes de empezar a usarlo.
- Es muy importante tomar la cantidad adecuada de muestra: unos **50 mg** si son **muestras sólidas o semi-sólidas** (una bolita pequeña de unos 3 mm de diámetro) y **100 µL** si son **muestras líquidas**; estas cantidades se extraen en 1 mL el tampón de dilución de la muestra incluido en el kit.
Un exceso de muestra con relación a la cantidad de tampón añadida impide que la cromatografía transcurra de forma correcta; esto es especialmente crítico en el caso de muestras sólidas o semi-sólidas ya que no es tan sencillo tomar la cantidad adecuada de muestra.
Un defecto de muestra con relación a la cantidad de tampón añadida puede afectar al resultado del test; esto es especialmente crítico en el caso de las muestras con baja concentración de analito.
- No tirar la caja externa del kit hasta que se haya utilizado todo el contenido. La caja contiene información esencial respecto al marcado CE del producto y lotificación.
- Cualquier incidente grave relacionado con el producto deberá comunicarse al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que estén establecidos el usuario y/o el paciente.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Se puede conservar a cualquier temperatura comprendida entre 2 y 30°C. La fecha de caducidad de cada componente está impresa en los envoltorios de aluminio. Se deben utilizar las tiras reactivas una vez atemperadas (si se almacenan refrigeradas) y abierto su envoltorio protector. El producto mantiene la estabilidad reclamada una vez abierto.

MUESTRAS

- Este test está diseñado para analizar muestras fecales humanas.
- Se recomienda recoger la muestra fecal tan pronto como aparezcan los síntomas.
- No usar muestras que hayan sido recogidas en medios de transporte o se les hayan añadido agentes de conservación (como formalina, SAF, PVA o similares) o medios de enriquecimiento ya que su presencia podría interferir con la correcta ejecución del test.
- Se recomienda analizar **muestras frescas sin tratar**. Si se tienen que conservar durante un tiempo, pueden guardarse en el frigorífico (+2-8°C) durante 1 o 2 días. Para tiempos más largos, deben congelarse a -20°C teniendo en cuenta que algunas muestras pierden inmunoreactividad tras haber sido congeladas.
- En caso de congelación, descongelar totalmente las muestras a temperatura ambiente antes de proceder a su análisis.
- Evitar ciclos de congelación y descongelación ya que se puede alterar el reconocimiento inmunológico de los parásitos.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Nota General: a lo largo del desarrollo del test, deben usarse guantes desechables debido al manejo de muestras infecciosas. Una vez finalizado el trabajo, proceder con la higiene de acuerdo al punto 4 del apartado "Precauciones".

- Homogeneizar previamente la muestra con el fin de que sea lo más representativa posible.
- Para **heces líquidas o semi-líquidas** añadir con ayuda de una pipeta **100 µL** de muestra a un micro-tubo de 1,5 mL etiquetado. Si la **muestra es sólida**, tomar una porción de aproximadamente **50 mg** (una bolita pequeña de unos **3 mm** de diámetro) y añadirla a un micro-tubo de 1,5 mL etiquetado.
- Añadir **1 mL de diluyente** de la muestra al micro-tubo anterior de 1,5 mL (o el volumen apropiado para mantener una proporción de 100 µL (~50 mg) de muestra en 1 mL de tampón de dilución).
- Agitar en el vórtex durante 30 segundos o el tiempo necesario para asegurar la total resuspensión de la muestra en el tampón. Si no se dispone de vórtex, agitar a mano de forma vigorosa logrando la resuspensión de la muestra fecal en el tampón.
- Centrifugar los micro-tubos de 1,5 mL durante 5 minutos a 700xg (unas 3000 rpm) en una centrífuga pequeña adaptada a estos micro-tubos para sedimentar las partículas sólidas. Si no se dispone de una centrífuga adecuada, esperar unos 3-5 minutos hasta que las partículas sólidas se hayan depositado en el fondo del tubo. En cualquier caso, el mejor funcionamiento del test se consigue usando una solución clara de la muestra extraída tras la centrifugación.
- Las heces, una vez extraídas, han de ser analizadas inmediatamente o dentro de las 6 horas siguientes a su extracción (ver apartado "Procedimiento").

PROCEDIMIENTO

Una vez que las muestras se han preparado como se indica en los apartados anteriores, se procede de la siguiente manera.

- Sacar el dispositivo de reacción de la bolsa de aluminio. Desechar la bolsita de desecante puesto que solo sirve para preservar el test de la humedad y no se emplea en la realización del test.
- Tomar **125 µL del sobrenadante** de la muestra con una pipeta graduada y añadirlo en la zona para la muestra del dispositivo de reacción (ventana circular señalada con una flecha). No añadir partículas sólidas con el líquido.
- Esperar **10 minutos**, leer e interpretar el resultado.

LECTURA DE RESULTADOS

Las cinco imágenes que aparecen a continuación en la Fig. 1 muestran algunos de los posibles resultados que se pueden obtener con Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest, pudiendo existir combinaciones de estos en caso que el paciente presente coinfecciones en los parásitos detectados.

Se distinguen 4 bandas coloreadas diferentes:

- Banda morada superior: constituye la banda de control que indica un correcto funcionamiento del test.
- Banda verde intermedia: indica presencia de *Entamoeba histolytica* en la muestra.
- Banda roja intermedia: indica presencia de *Giardia lamblia* en la muestra.
- Banda azul inferior: indica presencia de *Cryptosporidium spp.* en la muestra.

La banda morada de control debe aparecer siempre. La presencia adicional de cualquiera de las otras tres bandas coloreadas, indica la presencia de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y/o *Cryptosporidium spp.* en la muestra.







Tira 1	Tira 2	Tira 3	Tira 4	Tira 5	Tira 6
					
E: - G: - C: -	E: - G: - C: +	E: - G: + C: -	E: + G: - C: -	E: + G: + C: +	Inválido

Fig. 1: Modelos de posibles resultados del Crypto-Giardia-Entamoeba (C-G-E) MonlabTest.

- Tira 1:** resultado NEGATIVO. Solo aparece una línea transversal **MORADA** del dispositivo de reacción (alineada con la letra "C" marcada en la carcasa). Esta banda constituye la banda de control y debe aparecer siempre ya que indica que la cromatografía transcurre con normalidad.
 - Tiras 2-5:** resultados POSITIVOS:
 - Tira 2: Cryptosporidium positivo**
Aparece una línea **MORADA** (control) alineada con la letra "C" y una línea **AZUL** por debajo de la banda de control (alineada con el rótulo "1" marcado en la carcasa).
 - Tira 3: Giardia positivo**
Aparece una línea **MORADA** (control) alineada con la letra "C" y una línea **ROJA** por debajo de la banda de control (alineada con el rótulo "2" marcado en la carcasa).
 - Tira 4: Entamoeba positivo**
Aparece una línea **MORADA** (control) alineada con la letra "C" y una línea **VERDE** por debajo de la banda de control (alineada con el rótulo "3" marcado en la carcasa).
 - Tira 5: Cryptosporidium positivo + Giardia positivo + Entamoeba positivo**
Aparece una línea **MORADA** (control) alineada con la letra "C". Inmediatamente debajo de ella, aparece una línea **VERDE** (alineada con el rótulo "3" marcado en la carcasa), debajo de ésta aparece una línea **ROJA** (alineada con el rótulo "2" marcado en la carcasa) y debajo de ésta aparece una línea **AZUL** (alineada con el rótulo "1" marcado en la carcasa).
 - Tira 6:** resultados **INVÁLIDOS**
No aparece la banda de control **MORADA**, el color de la banda de control aparece claramente alterado o aparecen colores inespecíficos en las bandas positivas (diferentes a los indicados anteriormente). Esto indica un funcionamiento anómalo del test. Algunas de las causas que justifican este hecho pueden ser:
 - algunos de los reactivos se han deteriorado o el test ha caducado.
 - la muestra no se ha preparado de acuerdo a las instrucciones de uso.
 - la muestra tiene un alto contenido en sangre.
- Ante un resultado inválido, se recomienda repetir el test con una nueva tira siguiendo estrictamente las instrucciones de uso descritas en este manual. 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 los 10 minutos de reacción no tendrá valor diagnóstico.

NOTA: el diagnóstico final y definitivo lo establece el médico clínico. Este test sólo detecta *Cryptosporidium spp.*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* en una muestra, pero no constituye un argumento para afirmar que la persona padece de una infección por alguno de estos parásitos.

CONTROL DE CALIDAD

Si no aparece ninguna línea **MORADA** el test es inválido, ya sea porque se realizó incorrectamente o porque los reactivos se han deteriorado. En este caso, repetir el análisis ciñéndose estrictamente al protocolo de trabajo detallado en estas hojas de instrucciones. **ADVERTENCIA:** se recomienda la inclusión de controles externos de resultado conocido para asegurar que los datos obtenidos son correctos.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest sirve para la identificación diferencial de *Cryptosporidium spp.*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* detectando su presencia en heces humanas siempre y cuando la carga de los parásitos sea igual o superior al límite de detección del ensayo.
La detección de otras complicaciones como la criptosporidiosis pulmonar descrita en pacientes inmunodeprimidos, la mayoría de ellos con enfermedad VIH/SIDA avanzada, o la amebiasis extraintestinal en el caso de *Entamoeba histolytica* no son la intención de uso del test.
- Este test es cualitativo, no cuantitativo aunque la intensidad de las bandas positivas está relacionada con la cantidad de los parásitos detectable en la muestra fecal.
- El test ha demostrado una buena correlación con otras técnicas como la microscopía y PCR (en el caso de la detección de *E. histolytica*) tras analizar un elevado número de muestras fecales. Sin embargo, este estudio no excluye posibles interferencias en el funcionamiento del test al analizar otras muestras fecales.
- Es importante emplear la cantidad correcta de muestra. Con un defecto de muestra pueden aparecer resultados positivos muy débiles. En este caso se debe repetir el test con una cantidad mayor de muestra. Por otro lado, un exceso de muestra puede causar un desarrollo del test muy lento e incluso impedir el correcto desarrollo del test (no se ven las líneas control). En este caso se debe repetir el test con una cantidad menor de muestra (ver apartado "Preparación de las muestras fecales").
- Un resultado negativo no excluye la posibilidad de una infección por *Cryptosporidium spp.*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*. La no detección de estos parásitos puede ser resultado de factores como: la toma de muestra en un momento inadecuado de la enfermedad (la excreción de los parásitos en las heces suele ser discontinua); un incorrecto almacenamiento de la muestra; un transporte inadecuado de esta, etc.
- Un resultado positivo no excluye la presencia de otros agentes patógenos; puede darse una co-infección de algunos de estos tres parásitos con otros microorganismos. En cualquier caso, las co-infecciones solo pueden esclarecerse mediante un diagnóstico diferencial.
- Es importante controlar el tiempo de reacción. Si el tiempo de reacción es menor al indicado, las muestras que tienen una cantidad de analito superior al límite de sensibilidad se pueden observar claramente, pero las que están en el límite no aparecerán. Si el tiempo de reacción es mayor al indicado la sensibilidad del test se verá alterada pudiendo dar lugar a interpretaciones erróneas.
- 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.
- Debido a la homología entre *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* se ha comprobado que existe cierta reactividad cruzada con la especie no patógena *E. dispar* cuando se encuentra en la muestra a concentraciones iguales o superiores a $1,56 \times 10^5$ quistes/mL.
- Los resultados del test deben ser interpretados junto con la información disponible de los estudios epidemiológicos, valoración clínica del paciente y otros procedimientos de diagnóstico.
- No se han establecido los resultados de la prueba para verificar la eficacia de la erradicación (prueba de curación).

CAPACIDAD DE DETECCIÓN

Usando como estándar de referencia oocistos de *Cryptosporidium parvum* inactivados por radiación gamma (lote B971-627) procedentes de Biopoint (Biomérieux), se establece la capacidad de detección de Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest en matriz fecal para *Cryptosporidium* en $2,25 \times 10^5$ oocistos/mL.

Tomando como referencia el sobrenadante recolectado después del primer lavado de materia fecal de ratones infectados experimentalmente con *Cryptosporidium parvum* procedente de R-Biopharm, se establece la capacidad de detección de Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest en el tampón de dilución de la muestra para *Cryptosporidium* en $5,63 \cdot 10^4$ células/mL.

A partir de cultivos de *Giardia lamblia* (ATCC 30957) en sus dos formas biológicas posibles (quistes y trofozoitos), se establece la capacidad de detección de Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest en matriz fecal para *Giardia* como: 3120 quistes/mL y $6,09 \times 10^4$ trofozoitos/mL.

Utilizando el sobrenadante de un cultivo de *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS cuantificado procedente de R-Biopharm, se establece la capacidad de detección de Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest en matriz fecal para *E. histolytica* en 913 trofozoitos/mL.

ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Los anticuerpos monoclonales utilizados para la detección de *Cryptosporidium spp.*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* reconocen específicamente antígenos de estos parásitos.

Sin embargo, se ha detectado que los anticuerpos frente a *E. histolytica* presentan cierta reactividad cruzada con la especie *Entamoeba dispar*.

No se han detectado reacciones cruzadas con otros antígenos y/o microorganismos presentes en las muestras fecales. Ver el apartado de reactividad cruzada.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA

Evaluación interna

El estudio incluye el análisis de 114 muestras para *Cryptosporidium spp.* y 113 muestras para *Giardia lamblia* caracterizadas por microscopía como técnicas de referencia.

En el caso de *Entamoeba histolytica* se analizaron un total de 104 muestras caracterizadas por PCR como técnica de referencia, ya que por microscopía *E. histolytica* es morfológicamente indistinguible de las especies no patógenas *E. dispar* y *E. moshkovskii*.

Microscopía (*Cryptosporidium* y *Giardia*)

<i>Cryptosporidium spp.</i>	Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest	Microscopía	
		Positivo	Negativo
	Positivo	26	0
	Negativo	0	88

Concordancia sensibilidad= $26/(26+0) = >99,9\%$

Concordancia especificidad= $88/(88+0) = >99,9\%$

<i>Giardia lamblia</i>	Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest	Microscopía	
		Positivo	Negativo
	Positivo	54	0
	Negativo	1	58

Concordancia sensibilidad= $54/(54+1) = 98,2\%$

Concordancia especificidad= $58/(58+0) = >99,9\%$

La muestra discrepante, falso negativo, fue analizada con el ELISA RIDASCREEN® *Giardia* de R-Biopharm dando igualmente un resultado negativo, lo que sugiere que posiblemente se trata de una muestra positiva con una concentración muy baja en el parásito y está fuera del límite de sensibilidad de los inmunoensayos evaluados.

PCR (*Entamoeba histolytica*)

<i>Entamoeba histolytica</i>	Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest	PCR	
		Positivo	Negativo
	Positivo	9	4
	Negativo	0	91

Concordancia sensibilidad= $9/(9+0) = >99,9\%$

Concordancia especificidad= $91/(91+4) = 95,8\%$

Las 4 muestras discrepantes, falsos positivos, fueron analizadas por PCR en *E. dispar* dando un resultado negativo, por lo que se descarta que la reacción cruzada con esta especie sea el origen de la falsa positividad.

REPETIBILIDAD

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO:

Cinco réplicas de una serie de diluciones 1/2 de los estándares internos (curva de sensibilidad), así como de muestras reales establecidas como NC ("muestra negativa"), LPC ("muestra positiva débil") y PC ("muestra positiva") para cada analito detectado por el test, se midieron el mismo día por la misma persona.

No se detectaron diferencias entre las réplicas de cada analito ni con el estándar ni con las muestras, por lo que la repetitividad fue del 100%.

REPRODUCIBILIDAD

PRECISIÓN INTER-DÍA:

Con un mismo lote del Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest se midió una curva de sensibilidad y muestras reales establecidas como como NC ("muestra negativa"), LPC ("muestra positiva débil") y PC ("muestra positiva") para cada analito, por duplicado, a lo largo de cinco días espaciados en el tiempo. Con el estándar, la reproducibilidad fue del 100% con todos los analitos. En el caso de algunas muestras LPC, para los analitos Crypto y *Entamoeba* se observaron diferencias alrededor de media dilución 1/2 mientras que para *Giardia* la reproducibilidad fue del 100%. Con el resto de las muestras la reproducibilidad fue del 100% con los tres analitos.

PRECISIÓN INTER-OPERADOR:

Tres personas midieron por triplicado una curva de sensibilidad para cada analito y muestras reales establecidas como NC ("muestra negativa"), LPC ("muestra positiva débil") y PC ("muestra positiva") para cada analito. Las diferencias observadas no fueron, en ningún caso, superiores a una dilución 1/2 con el estándar y con las muestras reales las diferencias fueron menores o iguales a media dilución 1/2.

PRECISIÓN INTER-LOTE:

Tres lotes distintos de Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest se evaluaron en paralelo mediante el análisis de las curvas de sensibilidad habituales para este test y muestras reales establecidas como NC ("negative control"), LPC ("low positive control") y PC ("positive control") para cada analito. El análisis lo realizó una única persona el mismo día. Las máximas diferencias observadas fueron menores o iguales a media dilución 1/2 con el estándar, y con las muestras reales se obtuvieron los mismos resultados lo que evidencia una elevada precisión inter-lote del test.

EFEECTO HOOK O PROZONA

Se ha comprobado que Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest:

- No presenta efecto Hook en Crypto hasta concentraciones de *Cryptosporidium parvum* de $7,2 \times 10^6$ oocistos/mL en matriz fecal, cuando se usa como estándar de referencia oocistos de *Cryptosporidium parvum* inactivados por radiación gamma (lote B971-627) procedentes de Biopoint (Biomérieux).
- No se ha detectado efecto Hook en *Giardia* hasta concentraciones de *Giardia lamblia* de $1,6 \times 10^6$ quistes/mL en matriz fecal usando como estándar un cultivo cuantificado crecido a partir de la cepa ATCC 30957.
- No presenta efecto Hook en *Entamoeba* hasta concentraciones de *Entamoeba histolytica* de $2,3 \times 10^5$ trofozoitos/mL en matriz fecal usando como estándar el sobrenadante de un cultivo de *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS cuantificado procedente de R-Biopharm, si bien concentraciones muy elevadas de $9,3 \times 10^5$ trofozoitos/mL reducen levemente la intensidad de la señal.



SUSTANCIAS INTERFERENTES

Las siguientes sustancias no mostraron ningún efecto en los resultados del test cuando fueron añadidas a muestras de heces extraídas (negativa y positiva débil en el analito) a las concentraciones indicadas en la siguiente tabla:

Interferentes	Concentración	Interferentes	Concentración
Loperamida (Fortasec®)	6,25 µg/mL	Omeprazol	7,8 µg/mL
Racecadotril (Tiorfan®)	0,12 mg/mL	Lansoprazol	23,5 µg/mL
Gelatina tanato	1,17 mg/mL	Ibuprofeno	0,94 mg/mL
Diosmectita (Dialiv)	7 mg/mL	Ácido acetil- salicílico	1,6 mg/mL
Ultralevura (<i>Saccharomyc es boulardi</i> CNM I-745)	0,2 mg/mL	Paracetamol	1,6 mg/mL
Infloran (<i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Lactobacillus bifidus</i>)	1,17 x10 ⁶ cel/mL	Ácido palmítico/ esteárico	40 % (w/w)
Metronidazol	0,78 mg/mL	Mucina	3,5 % (w/w)
Vancomicina	2,34 mg/mL	Sulfato de bario	2,9 mg/mL
Subsalicilato de bismuto (Peptobismol®)	5 % (v/v)	Sangre	40 % (v/v)
Almagato (Almax®)	3,1 mg/mL		

REACTIVIDAD CRUZADA

Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest se testó frente a distintos organismos sin presentar reactividad cruzada con ninguno de ellos:

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *E.coli* O157:H7, *E.coli* ST131-025b, *E.coli* ST131, *E.coli* O6, *Salmonella typhimorium*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* y *Salmonella enteritidis* presentes a la concentración de 1 x 10⁷ células/mL; *Entamoeba dispar* y *H. pylori* CPY6271 de concentración desconocida y procedentes de BEI Resources diluidos diez veces en matriz fecal; y los virus Rotavirus A y Adenovirus 51 a TCID₅₀ ≥5x10²/mL, y Astrovirus Type 1 a TCID₅₀= 2,8x10⁶/mL y Norovirus I (clon W3) a TCID₅₀= 3,3x10⁶/mL.

Se ha observado reactividad cruzada en la línea de test de *Entamoeba histolytica* con *Entamoeba dispar* a concentraciones iguales o superiores a 1,56x10⁵ quistes/mL.

MODIFICACIONES RESPECTO A LA VERSIÓN ANTERIOR DE ESTE DOCUMENTO

Se mejora la estructura de la información general proporcionada al comienzo de las instrucciones, desglosando los diferentes puntos para ser coherentes con los requisitos del Reglamento IVDR.

Se desglosan mejor los componentes del kit.

En cuanto a los parámetros de funcionamiento del test, se han incluido modificaciones en los siguientes apartados: "Precauciones", "Almacenamiento", "Muestras", "Preparación de las muestras", "Lectura de resultados", "Limitaciones del procedimiento", "Capacidad de detección", "Especificidad analítica", "Sensibilidad y especificidad diagnóstica", "Repetibilidad", "Reproducibilidad", "Efecto Hook o prozona", anteriormente "Efecto Hook", "Sustancias interferentes" y "Reactividad cruzada".

BIBLIOGRAFÍA

- Goñi, P. *et al.*, Evaluation of an immunochromatographic dip strip test for simultaneous detection of *Cryptosporidium spp*, *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba histolytica* antigens in human faecal samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 31(8):2077- 82 (2012).
- Roka, M. *et al.*, Prevalence of intestinal parasites in HIV-positive patients on the island of Bioko, Equatorial Guinea: Its relation to sanitary conditions and socioeconomic factors. *Sci Total Environ.* 432: 404-11 (2012).
- Weitzel, T. *et al.*, Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. *Clin Microbiol Infect.* 12:656-659 (2006).
- Lake, I.R. *et al.*, Case-control study of environmental and social factors influencing cryptosporidiosis. *Eur J Epidemiol.* 22:805-811 (2007).
- Khalakdina, A. *et al.*, Is drinking water a risk factor for endemic cryptosporidiosis? A case-control study in the immunocompetent general population of the San Francisco Bay Area. *BMC Public Health.* 3: 1471-2458 (2003).
- Cacciò, S.M. *et al.*, Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* 21: 430- 437 (2005).
- Chalmers RM, *et al.*, Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends Parasitol;* 29(5):237-251(2013).
- Nygard, K. *et al.*, A large community outbreak of waterborne giardiasis-delayed detection in a non- endemic urban area. *BMC Public Health.* 6: 141 (2006).
- Monis, P.T., *et al.*, *Cryptosporidium* and *Giardia*- zoonoses: fact or fiction?. *Infect Genet. Evol.* 3: 233- 244 (2003).
- Ekdahl, K. *et al.*, Imported giardiasis: impact of international travel, immigration, and adoption. *Am. J. Trop. Med.* 72: 825-830 (2005).
- Hooshyar H., *et al.*, *Giardia lamblia* infection: review of current diagnostic strategies, *Gastroenterol Hepatol Bed Bench;*12(1):3-12 (2019).
- Rosoff JD, *et al.*, Isolation and identification of a *Giardia lamblia*-specific stool antigen (GSA 65) useful in coprodiagnosis of giardiasis. *J Clin Microbiol;* 23(5):905-910 (1986).
- Van den Bossche D, *et al.*, Comparison of four rapid diagnostic tests, ELISA, microscopy and PCR for the detection of *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium spp*, and *Entamoeba histolytica* in feces. *J Microbiol Methods;*110:78-84 (2015).
- Kantor M, *et al.*, *Entamoeba histolytica*: Updates in Clinical Manifestation, Pathogenesis, and Vaccine Development. *Can J Gastroenterol Hepatol.* Dec 2 (2018).
- Dolabella SS, *et al.*, Amoebic liver abscess production by *Entamoeba dispar*. *Ann Hepatol;* 11(1):107-117 (2012).
- Ungar, B. L. P. *et al.*, Use of a monoclonal antibody in an enzyme immunoassay for the detection of *Entamoeba histolytica* in fecal specimens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34: 465-472 (1985).
- Strachan, W. D. *et al.*, Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *The Lancet* 12: 561 - 563 (1988).
- Yau, Y. C. W. *et al.*, Development of monoclonal antibodies which specifically recognise *Entamoeba histolytica* in preserved stool samples. *39: 716-719 (2001).*
- Braga, L.L. Seropositivity for intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in Northeastern Brazil. *36: 3044-3045 (1998).*
- Petri Jr. W.A., *et al.*, Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. *58: 1802-1806 (1990).*

SÍMBOLOS UTILIZADOS PARA COMPONENTES Y REACTIVOS IVD



Fabricante



Contiene suficiente para <n> ensayos



Código



Número de lote



Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*



Uso de diagnóstico *in vitro*



Consultar las instrucciones de uso



Límite de temperatura



Fecha de caducidad

