

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



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.

**INTENDED USE**

Crypto-Giardia-Entamoeba MonlabTest chromatographic immunoassay is a procedure for *in vitro* qualitative detection of *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* antigens in human stool samples.

Cryptosporidiosis is a protozoal infection caused by *Cryptosporidium parvum* in humans. Typically, is an acute short-term infection, but can become severe and non-resolving in children and immunocompromised individuals such as AIDS patients. It may also be asymptomatic. In tropical developing countries, the parasite is often endemic and causes diarrhoea epidemics among children. With immunocompetent patients, the disease manifests itself as self-healing gastroenteritis.

Giardiasis in humans is caused by the protozoan parasite *Giardia lamblia*. This organism is involved in 25% of the cases of gastrointestinal disease and may be present asymptotically. *Giardia lamblia* has become an important cause of chronic diarrhoeas, particularly regarding travel medicine.

*Entamoeba histolytica* is the protozoan parasite responsible for dysentery and amebiasis. It is the third leading cause of morbidity and mortality due to parasitic disease in humans after malaria and schistosomiasis, and is estimated to be responsible for between 50000 and 100000 deaths every year. The disease may manifest itself as an acute, chronic or as an asymptomatic infection.

All these parasites present a simple life cycle that usually consists of an infective cyst stage and a multiplication trophozoite stage. Transmission of these infections occurs via ingestion of cysts, most often via food or water contaminated with human faecal matter.

Usually, diagnosis is performed by microscopic examination and requires experienced technicians. So it would be useful to develop an alternative method, rapid and easy-to-use, not requiring the presence of intact organisms (cysts or trophozoites) in the stool sample.

In the case of *Entamoeba*, a new understanding of this organism has led to the recognition that two species actually exist within what was previously known as *E. histolytica*. Of these two organisms *E. histolytica* is the pathogenic, causing all invasive disease while the other, *E. dispar* is non pathogenic as it is not capable of invading tissue. The two species are morphologically identical, so although diagnosis is usually performed by microscopic examination, it cannot differentiate them. Other techniques are required to detect specific antigens of each specie for an accurate diagnosis and to prevent unnecessary or inappropriate chemotherapy.

The test is based on the immunological capture of coloured microparticles as they move along a membrane on which the monoclonal antibody has been immobilized.

**PRINCIPLE**

Crypto-Giardia-Entamoeba Monlabtest use specific monoclonal antibodies against *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* that detect all forms of the parasites during their life cycle.

The tests are based on the use of three types of microspheres: blue microspheres covalently linked to a monoclonal anti-*Cryptosporidium parvum* antibody, red microspheres covalently linked to a monoclonal anti-*Giardia lamblia* antibody, green microspheres covalently linked to a monoclonal anti-*Entamoeba histolytica* antibody as well as purple microspheres used as test control.

The parasites present in stool samples react with the latex particles which are coated with specific monoclonal antibodies against the antigen. This *latex particles/antibodies/parasite* complex migrates through a chromatographic process towards the reaction area. In this area, anti-*Cryptosporidium*, anti-*Giardia* and anti-*Entamoeba* antibodies that react with the *latex particles/antibodies/parasite* complex are present. This reaction leads to the appearance of a blue and/or red and/or green lines. These lines are used to interpret the result, following a ten-minute room-temperature incubation.

**MATERIALS PROVIDED**

- 20 cassettes
- 1 Dilution buffer (30 ml)
- Instructions for use

**MATERIALS NOT INCLUDED IN THE KIT**

- Suitable applicators for sample collection (solid or liquid).
- Vortex mixer.
- Centrifuge adapted to sample extraction tubes.
- Test tubes or 1,5ml capped microtubes.
- Variable micropipettes.
- Pipette tips.
- Timer.
- Disposable gloves.

**PRECAUTIONS**

1. Patient samples (stool) may contain infectious agents and should be treated and disposed of as potentially dangerous biological materials.
2. The buffer contains sodium azide as antimicrobial agent. Avoid direct contact with skin and mucosa. Dispose of appropriately. Do not use the buffer if signs of contamination or precipitation are observed.
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 once you have finished working.
5. Do not exchange components from kits with different lot numbers.

6. All the reagents are for *in vitro* use exclusively.
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 beyond the expiration date.
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. If less amount than the indicated is used, the chromatography may not occur because the sample may not reach the reaction area; if an excess amount is used, brown lines may appear instead of blue, red, green or purple ones.
11. The used product should be disposed of as indicated by current legislation.
12. Do not use the test if a coloured line appears in the result area before its use.
13. It is important to take the appropriate amount of stool sample: 50 mg of solid stool or 100 µl of liquid stool to be extracted in 1 ml of diluent. It is very important to keep the correct sample: buffer ratio to ensure the correct performance of the test. **An excessive sample amount in regard to buffer amount prevents a correct chromatography.**
14. In order to ensure an adequate chromatography and optimum results, it is very important to centrifuge the 1.5 ml microtubes prior to extracting the specific quantity of supernatant. This is particularly true in the case of solid stool samples, as the greater number of suspended particles can interfere with the chromatography. However, if centrifugation is not possible, wait some minutes to settle solid particles.
15. Do not discard the external box of the kit until its content has been totally used. The external box contains essential information regarding the EC marking and component lots.

**STORAGE**

The kit can be stored at temperatures between 2°C and 30°C (it can be stored in a refrigerator). The expiration date is printed on the package.

**SAMPLES**

Stool samples should be collected in an appropriate sterile container as soon as possible after symptom onset. The sample should be representative, whenever possible.

The samples can be stored in the refrigerator (at approximately 4°C) for 1-2 days before being analysed. For a longer storage period, store the samples in a freezer at -20°C, with no further handling. In this case, the sample must be completely thawed, brought to room temperature and homogenized before analysis.

Avoid freezing and thawing the samples several times. Do not use specimens that have been collected or stored in transport medium or preserving agents like 10 % formalin, SAF, PVA, Ecofix, etc., because they interfere with the test.

Pay special attention when analyzing hemorrhagic samples as they often give false positive results when the blood content is high.

**PROCEDURE OF SAMPLE PREPARATION**

1. **Important:** Obtain samples from three different sampling sites at least, in order to get a sample as much representative as possible.
2. Dispense **1.0 ml of extraction buffer** in a properly labelled testing tube.
3. **Add** a portion of solid sample of approximately **50 mg** with a swab, a wooden applicator or a bacteriology loop (homogenize the sample before collecting). For **liquid or semi-solid stools** add **100 µl** of stool using an appropriate pipette.
4. **Shake** the test tube thoroughly by using a vortex mixer to assure proper mixing.
5. **Centrifuge** 5 minutes at 700 xg (approximately 3000 rpm in a benchtop centrifuge) to settle solid particles. If a centrifuge is not available, wait 3-5 minutes for the solid particles to settle at the bottom of the tube. In any case, please note that optimum test performance is achieved when centrifugation takes place (this is especially important with solid samples as is indicated in Precautions section).

**PROCEDURE**

1. Following preparation of the sample, take the reaction device out of the aluminum pouch. Discard the small bag of desiccant as it is not used during the test; its only purpose is to protect the test against moisture.
2. Add **125 µl of the supernatant** prepared in the "Procedure of sample preparation" section into the sample area of the reaction device (round window marked with an arrow). Do not add solid particles along with the liquid.
3. Incubate the test at room temperature for **10 minutes** and read the results.

**READING OF RESULTS**

**NEGATIVE:** Only a single **PURPLE** line appears in the result area, aligned with the letter "C" (Control) marked on the device frame. This line should always appear.

**POSITIVE:**

**Cryptosporidium:** A **PURPLE** line and a **BLUE** line appear in the result area, aligned with the number "1" (Test) marked on the device frame. The intensity may vary according to the antigen concentration present in the sample.

**Giardia lamblia:** A **PURPLE** line and a **RED/PINK** line appear in the result area, aligned with the number "2" (Test) marked on the device frame. The intensity can vary according to the antigen concentration present in the sample.

**Entamoeba histolytica:** A **PURPLE** line and a **GREEN** line appear in the result area, aligned with the number "3" (Test) marked on the device frame. The intensity can vary according to the antigen concentration present in the sample.

**INVALID:** the purple control band does not appear or the purple colour of this band is clearly altered, also nonspecific colours in the positive bands are invalid results. This indicates an anomalous test performance. Possible reasons are:



- Some reagents have got damaged or the test has expired.
- The sample was not prepared according to the instructions of use.
- High blood content in the sample.

In the event of an invalid result it is recommended that another test is run, strictly following the protocol described in this manual. For blood samples, it is advisable the use of an alternative technique because the problem of destabilization does not usually depend on the cassette but of the sample matrix.

Any line that may appear beyond 10 minutes due to the nature of the sample has no diagnostic value.

Final diagnosis should not be based only on the results from a single test. The diagnosis should be established by the correlation of test results with other appropriate data and with clinical symptoms.

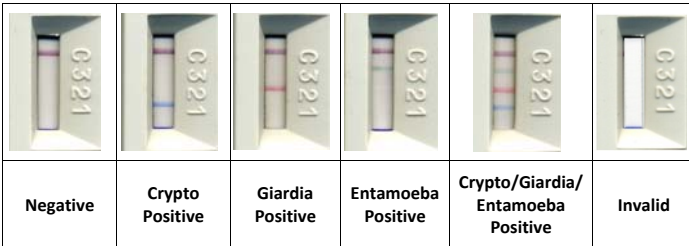
Interpretation code for cassette images.

C: *Cryptosporidium parvum*

G: *Giardia lamblia*

E: *Entamoeba histolytica*

N: Negative



### QUALITY CONTROL

The test is invalid if no purple line appears, whether because the test was not properly performed or the reagents have deteriorated. If this happens, repeat the analysis, following the working protocol indicated in these instruction sheets closely.

**WARNING:** Including a control with an established result is recommended to ensure that the data obtained are correct.

### PROCEDURE LIMITATIONS

- The test should be used only for detecting *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* antigens in human stool.
- This is a qualitative test so no quantitative interpretation of the results should be made with respect to the intensity of the positive line.
- Over 200 samples were evaluated to ensure proper test performance. The correlation of results with other techniques (ELISA) was good. However, interferences in the test performance cannot be excluded.
- If there is an excessive sample amount, brown lines may appear instead of the blue, red, green and purple ones, or test and control lines may be absent because chromatography is not correctly conducted. The 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.
- Due to the homology between *E. histolytica* and *E. dispar*, certain cross-reaction may occur between these two species but it is expected to be less than a 5%. No crossreaction with other substances has been observed during test evaluation.
- A negative result does not totally exclude the possibility of *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica* infection. The significance of the results should be evaluated in relation to the patient's clinical symptoms.
- It is observed that faecal samples with high blood content may interfere negatively with the test. In these cases, specificity problems (false positive results) may appear with negative samples.
- The analysis of certain samples can produce lines of imprecise colour, mostly corresponding to negative samples. The test should be repeated if lines of indeterminate colour appear. If the same result is obtained again, the analysis should be performed by another analytic method.

### DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

Monlab immunochromatographic tests designed for *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*: Crypto, Giardia, Crypto/Giardia, Entamoeba, and Crypto/Giardia/Entamoeba were externally and internally evaluated against different reference techniques, depending on the case, (Microscopy, ELISA and/or PCR) several times. The results were as follows:

*Cryptosporidium parvum*:

Crypto MonlabTest		Reference techniques	
		Microscopy	ELISA Crypto Ridascreen
MonlabTest Crypto/ Giardia/Entamoeba	Sensitivity	80.0%	79.3%
	95% Confidence Interval	71.1-87.2	72.0-85.5
	Specificity	96.9%	99.5%
	95% Confidence Interval	95.0-98.2	98.5-99.9

*Giardia lamblia*:

Giardia MonlabTest		Reference techniques	
		Microscopy	ELISA Giardia Ridascreen
MonlabTest Crypto/ Giardia/Entamoeba	Sensitivity	92.4%	93.8%
	95% Confidence Interval	87.3-95.9	89.2-96.9
	Specificity	98.6%	98.9%
	95% Confidence Interval	97.3-99.3	97.6-99.6

*Entamoeba histolytica*:

Entamoeba MonlabTest		Reference techniques	
		ELISA Entamoeba Ridascreen	PCR E. histolytica
MonlabTest Crypto/ Giardia/Entamoeba	Sensitivity	82.4%	75.0%
	95% Confidence Interval	71.2-90.5	53.33-90.2
	Specificity	96.4%	89.8%
	95% Confidence Interval	94.1-97.9	86.4-92.6

### REPEATABILITY

INTRA-ASSAY PRECISION

Triplicates for each concentration of the sensitivity curve were assayed with one lot of the product, obtaining the same results.

### REPRODUCIBILITY

INTER-DAY PRECISION: Using one product lot, triplicates of the sensitivity curve were performed over 10 consecutive days by the same person. Only one difference, of less than one 1:2 dilution, was found, which is acceptable and tolerable for a qualitative immunochromatography technique.

INTER-LABORATORY PRECISION: Five different laboratory technicians assayed the same samples, obtaining high precision and concordance. Only a difference of one 1:2 dilution was found, which is acceptable and tolerable for a qualitative immunochromatography technique.

INTER-LOT PRECISION: A sensitivity curve was performed using three product lots. The analyses were performed by the same person on the same day. Only one difference, of less than one 1:2 dilution, was found, which is acceptable and tolerable for a qualitative immunochromatography technique.

### HOOK EFFECT

In the case of *Crypto* and *Giardia*, a standard concentration was not available. However, analysis of the sensitivity curve at the maximum internal standard concentration available, did not show the existence of any hook effect.

Concerning *Entamoeba histolytica* the prozone or hook effect of the test was studied using a quantified number of cysts. The results shown that there is IC prozone but is not inhibitory, at least, at the concentrations studied.

The analysis shown a lower reactivity around  $9 \times 10^6$  cysts/ml of *E. histolytica* HM-1. This cyst concentration is approximately 640 times the concentration of the sensitivity limit of the test (14000-28000 cysts/ml).

### INTERFERING SUBSTANCES

The substances indicated in the table, at the specified concentration, did not interfere with the results. Only Ibuprofen\* at higher concentration could interfere in the detection of a very low *Giardia* positive sample. A single lot was used to conduct the study.

Metronidazole	1.2 mg/ml
Racecadotril	0.72 mg/ml
Loperamide	24 µg/ml
Braun Atropine	1.68 µg/ml
Cimetidine	1.92 mg/ml
Omeprazole	0.144 mg/ml
Neomycin	6.62 mg/ml
Ampicillin	7.2 mg/ml
Ibuprofen*	5.76 mg/ml
Acetylsalicylic Acid	4.8 mg/ml
Sucrose	8 mg/ml
Blood	10% (v/v) →The sample was prepared by adding fresh blood directly on the matrix.

INTERFERING MICROORGANISMS

The microorganisms indicated below did not cause any interference in the results.

**Bacteria/Parasites/Viruses**














<i>Entamoeba coli</i>	<i>Iodamoeba bütschlii</i>	<i>Hymenolepis nana</i>
<i>Giardia lamblia</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Blastocystis hominis</i>	<i>Endolimax nana</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>Entamoeba hartmannii</i>	Rotavirus	Adenovirus



**REFERENCES**

1. 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).
2. 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).
3. 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).
4. Lake, I.R. et al., Case-control study of environmental and social factors influencing cryptosporidiosis. *Eur J Epidemiol*. 22:805-811 (2007).
5. 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).
6. Cacciò, S.M. et al., Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol*. 21: 430-437 (2005).
7. Certad, G. et al., *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infect. Agent. Cancer* 2: 22 (2007).
8. 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).
9. Monis, P.T., and Thompson, R.C.A. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction?. *Infect Genet. Evol*. 3: 233-244 (2003).
10. Ekdahl, K. and Andersson, Y. Imported giardiasis: impact of international travel, immigration, and adoption. *Am. J. Trop. Med*. 72: 825-830 (2005).
11. 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).
12. Strachan, W. D. et al., Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *The Lancet* 12: 561 - 563 (1988).
13. Yau, Y. C. W. et al., Development of monoclonal antibodies which specifically recognise *Entamoeba histolytica* in preserved stool samples. 39: 716-719.
14. Braga, L.L. Seropositivity for intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in Northeastern Brazil. 36: 3044-3045.
15. 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).
16. Paniagua, G.L. et al., Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. 28: 17 (2007).
17. Haque, R. et al., *Entamoeba histolytica* infection in children and protection from subsequent amebiasis. 74: 904-909 (2006)

**SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS**

	Manufactured by		For in vitro diagnostic use
	Do not re-use		Please read pack insert
	Contains sufficient for <n> tests		Dry storage
	Catalogue number		Store at
	Lot number		Expiry date
	This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices		Dilution buffer
	Reagent		



## 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.

### PRINCIPIO DEL MÉTODO

El inmunoensayo cromatográfico Crypto/Giardia/ Entamoeba MonlabTest es un procedimiento para la detección cualitativa *in vitro* de antígenos de *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* en heces humanas.

*Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* son tres de los principales grupos de protozoos causantes de infecciones gastrointestinales.

La *Cryptosporidiosis* es una infección protozoaria causada por *Cryptosporidium parvum* en humanos. Habitualmente es una infección aguda de corta duración, aunque también puede ser asintomática. Sin embargo, en el caso de niños o pacientes inmunocompetentes los síntomas pueden ser más graves ya que las diarreas tienen un curso peor y son persistentes. Aunque es un parásito que está extendido por todo el mundo, en países tropicales en desarrollo la enfermedad suele ser endémica y causa diarreas epidémicas sobre todo entre los niños.

*Giardia lamblia* es el parásito causante de la Giardiasis en humanos. Este organismo suele ser el responsable del 25% de las enfermedades gastrointestinales aunque también puede cursar de forma asintomática. 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.

*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 50000-100000 muertes cada año. La enfermedad puede manifestarse como una infección aguda, crónica o asintomática.

El ciclo de vida de estos tres parásitos es relativamente sencillo. La infección se produce mediante la ingestión oral de quistes, a partir de los cuales se desarrolla la forma vegetativa del parásito o trofozoito que comienza su diferenciación y proliferación. La vía de transmisión más frecuente es la ingesta de quistes presentes en agua o comida contaminada con material fecal humano.

El método de diagnóstico tradicional consiste en el examen microscópico de las heces por lo que es necesario un personal experimentado para su reconocimiento. Por este motivo, es interesante el desarrollo de un método alternativo, rápido y sencillo que no requiera la presencia del organismo intacto para su reconocimiento.

En el caso de *Entamoeba histolytica*, es especialmente importante disponer de técnicas que permitan detectar antígenos específicos de esta especie para su correcta identificación, ya que la especie no patógena *Entamoeba dispar* es morfológicamente idéntica por lo que no puede diferenciarse de *E. histolytica* mediante microscopía.

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

### SIGNIFICADO CLÍNICO

El test Crypto/Giardia/Entamoeba MonlabTest utiliza anticuerpos monoclonales específicos frente a *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* que detectan todas las formas del ciclo vital de los parásitos.

Se utilizan microesferas azules unidas covalentemente a un anticuerpo monoclonal anti-*Cryptosporidium parvum*, microesferas rojas unidas covalentemente a un anticuerpo monoclonal anti-*Giardia lamblia*, microesferas verdes unidas covalentemente a un anticuerpo monoclonal anti-*Entamoeba histolytica* y microesferas moradas como control del test.

El parásito presente en las muestras de heces reacciona con las partículas de látex que están recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos frente al antígeno. Este complejo de partículas de látex/anticuerpos/parásito migra por un proceso cromatográfico en la zona de reacción. En esta zona hay anticuerpos anti-*Cryptosporidium*, anti-*Giardia* y anti-*Entamoeba* que reaccionan con el complejo partículas de látex/anticuerpos/parásito. Esta reacción origina la formación de una línea azul en el caso de *Cryptosporidium parvum*, una línea roja en el caso de *Giardia lamblia*, y una línea verde en el caso de *Entamoeba histolytica*. Estas líneas se usan para interpretar el resultado, a los diez minutos de incubación a temperatura ambiente.

MATERIAL SUMINISTRADO	MATERIAL NECESARIO PERO NO PROPORCIONADO
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 20 casetes</li> <li>- 1 tampón de dilución (30 ml)</li> <li>- Instrucciones de uso</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dispositivos adecuados para la toma de muestra fecal (sólida o líquida).</li> <li>- Vortex o agitador.</li> <li>- Centrífuga adaptada a los tubos donde se lleva a cabo la extracción de la hez.</li> <li>- Microtubos de plástico con cierre de 1,5 ml o tubos de ensayo.</li> <li>- Pipetas graduables.</li> <li>- Puntas de pipetas.</li> <li>- Cronómetro.</li> <li>- Guantes desechables.</li> </ul>

### PRECAUCIONES

1. Las muestras de los pacientes (heces) pueden contener agentes infecciosos y deberán ser tratadas y desechadas como materiales biológicos potencialmente peligrosos.
2. El tampón contiene azida de sodio como agente antimicrobiano. Evitar el contacto directo con la piel y las mucosas. Desechar de forma apropiada. No usar el tampón si manifiesta indicios de contaminación o precipitación.
3. No comer, beber, fumar, almacenar o preparar alimentos en la zona donde se manejan los reactivos y las muestras.
4. Llevar guantes desechables al manejar las muestras. Lavarse bien las manos al acabar de trabajar.
5. No intercambiar los componentes de kits con distinto número de lote.
6. Utilizar todos los reactivos únicamente *in vitro*.
7. Antes de usarlos, dejar que todos los componentes del kit y muestras alcancen la temperatura ambiente, pues reactivos y/o muestras fríos pueden reducir la funcionalidad del test. Se recomiendan de 20 a 30 minutos para alcanzar la temperatura ambiente.
8. No usar los componentes del kit después de las fechas de caducidad.
9. En caso de rotura del envase, el producto puede ser utilizado siempre que ninguno de los componentes haya sido dañado.
10. Es importante añadir la cantidad correcta de muestra (ver apartados de procedimiento según formato del test). 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 azules, rojas, verdes o moradas.
11. El producto usado debe desecharse conforme a la legislación vigente.
12. No usar el test si aparece alguna línea de color en la zona de resultados antes de empezar a usarlo.
13. Es importante tomar la cantidad de hez adecuada: 50 mg de heces sólidas ó 100 µl de heces líquidas, para su extracción en 1ml de diluyente. Es muy importante mantener esta proporción muestra: tampón para asegurar el correcto funcionamiento del test. Un exceso de muestra en relación a la cantidad de tampón añadida impide la correcta cromatografía.
14. Se recomienda centrifugar los microtubos de 1,5 ml antes de tomar la cantidad específica de sobrenadante para asegurar la correcta cromatografía y conseguir que el test funcione con sus mejores prestaciones. Si no es posible centrifugar, se debe esperar unos minutos a que las partículas sólidas sedimenten ya que las partículas en suspensión pueden interferir en la cromatografía. Esto es especialmente crítico en el caso de heces sólidas al tener más partículas en suspensión que pueden interferir en la cromatografía.
15. 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.

### CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

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

### MUESTRAS

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

Las muestras pueden guardarse en el refrigerador (4°C aprox.) durante 1 ó 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.

Evitar sucesivas congelaciones/descongelaciones de las muestras, así como aquellas tratadas con agentes de conservación como formalina 10%, SAF, PVA, Ecofix, etc. ya que estos agentes interfieren en el test.

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

### PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS

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 o microtubo por muestra. Añadir aproximadamente 1 ml de tampón.
3. Tomar una pequeña cantidad de heces sólidas, aproximadamente 50 mg (homogeneizar bien la muestra sólida original antes de tomar la porción adecuada) 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 µl de muestra.
4. Agitar vigorosamente con la ayuda de un vortex para asegurar una mezcla homogénea de la muestra en el tampón.
5. Centrifugar 5 minutos a 700 xg (aproximadamente 3000 rpm) para clarificar la muestra. 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. Tener presente que los resultados óptimos se obtienen cuando se centrifugan los microtubos ya que el test funciona con sus mejores prestaciones (esto es especialmente crítico con muestras sólidas como se comenta en el apartado de Precauciones).





### PROCEDIMIENTO

- Tras la preparación de la muestra, 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.
- Añadir **125 µl del sobrenadante** obtenido de "Procedimiento preparación de muestras" en la zona para la muestra del dispositivo de reacción (ventana circular señalada con una flecha). No añadir partículas sólidas con el líquido.
- Incubar el test a temperatura ambiente durante **10 minutos**, leer e interpretar el resultado.

### LECTURA E INTERPRETACIÓN

**NEGATIVO:** Aparece una sola línea **MORADA** en la zona de resultados, alineada con la letra "C" (control) marcada en la carcasa. Siempre debe aparecer esta línea.

#### POSITIVO:

**Cryptosporidium:** Aparecen la línea **MORADA** y otra **AZUL** en la zona de resultados, alineada con el número "1" (test) marcada en la carcasa. La intensidad puede variar según la concentración presente de antígeno.

**Giardia:** Aparecen una línea **MORADA** y otra **ROJA/ROSA** en la zona de resultados, alineada el número "2" (test) marcada en la carcasa. La intensidad puede variar según la concentración presente de antígeno.

**Entamoeba:** Aparecen una línea **MORADA** y otra **VERDE** en la zona de resultados, alineada el número "3" (test) marcada en la carcasa. La intensidad puede variar según la concentración presente de antígeno.

**INVÁLIDO:** no aparece la banda de control morada, el color morado de la banda de control aparece claramente alterado o aparecen colores inespecíficos en las bandas positivas del test. 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 un nuevo casete siguiendo estrictamente las instrucciones de uso. 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 del casete empleado sino de la propia matriz de la muestra.

Toda línea que por la naturaleza de la muestra pueda aparecer pasados 10 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 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 instrucciones.

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

### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- El test debe usarse sólo para la detección de antígenos de *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* en heces humanas.
- El test es cualitativo y no se debe hacer ninguna interpretación cuantitativa del resultado en relación directa a la intensidad de la línea positiva.
- Más de 200 muestras fueron evaluadas para asegurar el correcto funcionamiento del test. La correlación de resultados con otras técnicas (ELISA) fue buena. Sin embargo, no se deben excluir interferencias en el funcionamiento del test.
- Con un exceso de muestra pueden aparecer líneas marrones en vez de azules, rojas, verdes y moradas o bien no aparecer las líneas test y control al no poder cromatografiar correctamente. Las líneas marrones no tienen ningún valor diagnóstico. En este caso se debe repetir el test con una cantidad menor de muestra o diluir el extracto.
- 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*. Sin embargo, los estudios realizados indican que es inferior al 5%. No se ha observado ninguna reacción cruzada con otras sustancias en la evaluación del test.
- Un resultado negativo no excluye totalmente una posible infección por *Cryptosporidium*, *Giardia* o *Entamoeba*. La importancia de los resultados debe ser evaluada con relación a los síntomas clínicos del paciente.
- 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 los tres análisis reconocidos por la tira.
- 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 caso de obtener el mismo resultado se sugiere realizar el análisis con otro método analítico.

### SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

Los tests de Monlab diseñados para la detección de *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*: Crypto, Giardia, Crypto/Giardia, Entamoeba, y Crypto/Giardia/Entamoeba se evaluaron externa e internamente en repetidas ocasiones frente a distintas técnicas de referencia (Microscopía, ELISA y/o PCR) según el caso. Los resultados fueron los siguientes:

#### Cryptosporidium parvum:

Test de MONLAB para Crypto evaluados		Técnicas de referencia	
		Microscopía	ELISA Crypto Ridascreen
MonlabTest Crypto/ Giardia/Entamoeba	Sensibilidad	80,0%	79,3%
	Intervalo de confianza 95%	71,1-87,2	72,0-85,5
	Especificidad	96,9%	99,5%
	Intervalo de confianza 95%	95,0-98,2	98,5-99,9

#### Giardia lamblia:

Test de MONLAB para Giardia evaluados		Técnicas de referencia	
		Microscopía	ELISA Giardia Ridascreen
MonlabTest Crypto/ Giardia/Entamoeba	Sensibilidad	92,4%	93,8%
	Intervalo de confianza 95%	87,3-95,9	89,2-96,9
	Especificidad	98,6%	98,9%
	Intervalo de confianza 95%	97,3-99,3	97,6-99,6

#### Entamoeba histolytica:

Test de MONLAB para Entamoeba evaluados		Técnicas de referencia	
		ELISA Entamoeba Ridascreen	PCR E. histolytica
MonlabTest Crypto/ Giardia/Entamoeba	Sensibilidad	82,4%	75,0%
	Intervalo de confianza 95%	71,2-90,5	53,33-90,2
	Especificidad	96,4%	89,8%
	Intervalo de confianza 95%	94,1-97,9	86,4-92,6

### REPETIBILIDAD

#### PRECISIÓN INTRAENSAYO

Se ensaya por triplicado cada concentración de la curva de sensibilidad con un lote del test y se obtienen los mismos resultados.

### REPRODUCIBILIDAD

**PRECISIÓN INTERDÍA:** Con un lote de producto, se evalúan tres réplicas de la curva de sensibilidad a lo largo de diez días consecutivos por la misma persona. Sólo se aprecia una diferencia menor a una dilución 1/2, asumible y tolerable por una técnica inmunocromatográfica cualitativa.

**PRECISIÓN INTERLABORATORIO:** Cinco operadores ensayan esas mismas muestras manteniendo precisiones y concordancias elevadas. Sólo se aprecia una diferencia de una dilución 1/2, asumible y tolerable por una técnica inmunocromatográfica cualitativa.

**PRECISIÓN INTERLOTE:** Con tres lotes de producto se realiza una curva de sensibilidad. El análisis lo realiza la misma persona y en el mismo día. Sólo se aprecia una diferencia menor a una dilución 1/2, asumible y tolerable por una técnica inmunocromatográfica cualitativa.

### EFECTO HOOK

En el caso de *Crypto* y *Giardia* no se ha dispuesto de un estándar de concentración conocida, pero el análisis de la curva de sensibilidad partiendo de la máxima concentración disponible del estándar interno no ha revelado la existencia de efecto hook.

Para *Entamoeba histolytica* el análisis se llevó a cabo con una muestra caracterizada en concentración de quistes. Los resultados indicaron que existe prozona pero no es inhibitoria, al menos, en las concentraciones de quistes estudiadas.

Los resultados mostraron una reactividad mínima a una concentración aproximada de  $9 \times 10^6$  quistes/ml de *E. histolytica* HM-1 que equivale a unas 640 veces el límite de sensibilidad del test (14000-28000 quistes/ml).

### INTERFERENCIAS

Las sustancias descritas en la tabla, y a la concentración indicada no dieron lugar a interferencia en el resultado, con la excepción del Ibuprofeno\* que a elevadas concentraciones podría interferir en la detección de muestras positivas muy débiles en *Giardia*. Se utilizó un lote para realizar el estudio.

Metronidazol 1,2 mg/ml
Racecadotril 0,72 mg/ml
Loperamida 24 µg/ml
Atropina Braun 1,68 µg/ml
Cimetidina 1,92 mg/ml
Omeprazol 0,144 mg/ml
Neomicina 6,62 mg/ml
Ampicilina 7,2 mg/ml
Ibuprofeno* 5,76 mg/ml
Ácido acetilsalicílico 4,8 mg/ml



Sacarosa 8 mg/ml

Sangre 10% (v/v) → La muestra se preparó adicionando sangre fresca directamente sobre la matriz.

#### MICROORGANISMOS INTERFERENTES

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














#### Bacterias/Parásitos/Virus

<i>Entamoeba coli</i>	<i>Iodamoeba bütschlii</i>	<i>Hymenolepsis nana</i>
<i>Giardia lamblia</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Blastocystis hominis</i>	<i>Endolimax nana</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>Entamoeba hartmannii</i>	Rotavirus	Adenovirus

#### 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).
- Certad, G. et al., *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infect. Agent. Cancer* 2: 22 (2007).
- 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., and Thompson, R.C.A. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction?. *Infect Genet. Evol.* 3: 233-244 (2003).
- Ekdahl, K. and Andersson, Y. Imported giardiasis: impact of international travel, immigration, and adoption. *Am. J. Trop. Med.* 72: 825-830 (2005).
- 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.
- Braga, L.L. Seropositivity for intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in Northeastern Brazil. 36: 3044-3045.
- 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).
- Paniagua, G.L. et al., Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. 28: 17 (2007).
- Haque, R. et al., *Entamoeba histolytica* infection in children and protection from subsequent amebiasis. 74: 904-909 (2006)

#### SÍMBOLOS UTILIZADOS PARA COMPONENTES Y REACTIVOS IVD

	Fabricante		Uso de diagnóstico <i>in vitro</i>
	No reutilizar		Consultar las instrucciones de uso
	Contiene suficiente para <n> ensayos		Mantener seco
	Código		Límite de temperatura
	Número de lote		Fecha de caducidad
	Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico <i>in vitro</i>		Tampón de dilución
	Reactivo		

