
CERTEST

Crypto+Giardia

ONE STEP

Crypto+Giardia COMBO CARD
TEST

CERTEST BIOTEC S.L.





CERTEST *Crypto+Giardia*

One Step test to detect *Cryptosporidium* and *Giardia* in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Cryptosporidium* y *Giardia* en formato cassette

ENGLISH

INTENDED USE

CerTest *Crypto+Giardia* one step combo card test is a coloured chromatographic immunoassay for the simultaneous qualitative detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* (α 1-*giardin* and/or CWP1) in stool samples.

CerTest *Crypto+Giardia* combo card test offers a simple and a highly sensitive screening assay to make a presumptive diagnosis of cryptosporidiosis and/or giardiasis.

INTRODUCTION

Giardia and *Cryptosporidium* are parasites that can be found in water. *Giardia* causes an intestinal illness called giardiasis. *Cryptosporidium* is responsible for a similar illness called cryptosporidiosis. These infections have become the most common causes of waterborne diseases (found in both drinking and recreational water) in humans.

Giardia, a flagellated protozoan, inhabits the upper part of the small intestine of its host and has a two major states in the life cycle: trophozoites which produces the antigens (α -1 *giardin*) and cyst with produces the antigens (CWP1) After the host ingest the cysts, which are the infective stage, the trophozoites emerge from the cysts in the duodenum and attach to the small intestinal mucosa. They undergo mitotic division in the intracellular lumen, some will encyst to protect themselves and will be eliminated from the host in the feces. The trophozoite is the vegetative form and replicates in the small intestine.

Giardiasis is a diarrheal illness caused by a very small parasite, *Giardia intestinalis* (also known as *Giardia lamblia* and *Giardia duodenalis*). Once an animal or person is infected with *Giardia*, the parasite lives in the intestine and is passed in the stool. The parasite is protected by an outer shell and can survive outside the body and in the environment for a long time. The most common symptoms of giardiasis include: diarrhea, loose or watery stool, stomach cramps and upset stomach. These symptoms generally begin 1-2 weeks after infection, and may last 2-6 weeks in healthy individuals. Sometimes symptoms last longer and may lead to weight loss and dehydration. Some people will have no symptoms. However, people with weakened immune systems (e.g., persons with HIV/AIDS, cancer patients, and transplant patients) or the elderly may have a more serious infection that can lead to severe illness or death.

Cryptosporidium parvum is the major cause of persistent diarrhoea in developing countries. This parasite is recognised as a highly infectious enteric pathogen and infective stage is transmitted by the fecal-oral route. Symptoms of cryptosporidiosis include watery diarrhoea, stomach cramps, weight loss, nausea and sometimes fever.

TEST PRINCIPLE

CerTest *Crypto+Giardia* is based on the principle of a qualitative immunochromatographic assay for the determination of *Cryptosporidium* and *Giardia* (α 1-*giardin* and CWP1) antigens in stool samples. The strip B (*Giardia*) detect trophozoites and cyst.

Strip A consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against *Cryptosporidium* and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-*Cryptosporidium*) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming coloured conjugate complexes.

Strip B consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against *Giardia* and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-*Giardia*) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming coloured conjugate complexes.

If the sample is *Cryptosporidium* positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugate complex (anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in the strip A, and if the sample is *Giardia* positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugate complex (anti-*Giardia* monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in strip B, which were previously pre-dried on the absorbent pad. The mixture then moves upward on the membrane, by capillary action. As the sample flows through the test membrane, the binding conjugate complexes migrate. The anti-*Cryptosporidium* antibodies present on the membrane of strip A (test line) and the anti-*Giardia* antibodies present on the membrane of strip B (test line) capture the coloured conjugate and the red line will be visible in both strips. These bands are used to interpret the result.

If the sample is negative, there is no *Cryptosporidium* and *Giardia* presence and yet, the antigens may be present in a concentration lower than the detection limit values, for which the reaction will not take place with any red-coloured conjugate complex. The anti-*Cryptosporidium* and anti-*Giardia* antibodies present on the membranes (test lines) will not capture the antigen-red-coloured conjugate complex (not formed), for which the red lines will not appear.

Whether the sample is positive or not, in both strips, the mixture continues to move across the membranes to the immobilized specific antibodies placed in the control lines. The anti-specific protein antibodies present on both membranes will capture control green-conjugate



complex and both control lines will always appear. The presence of these green lines serve as: 1) verification that sufficient volume is added, 2) that proper flow is obtained and 3) an internal control for the reagents.

STORAGE AND STABILITY

Store as packaged in the sealed pouch at 2-30°C. The test is stable until the expiration date marked on its sealed pouch. The test must remain in the sealed pouch until use. Do not freeze.

PRECAUTIONS

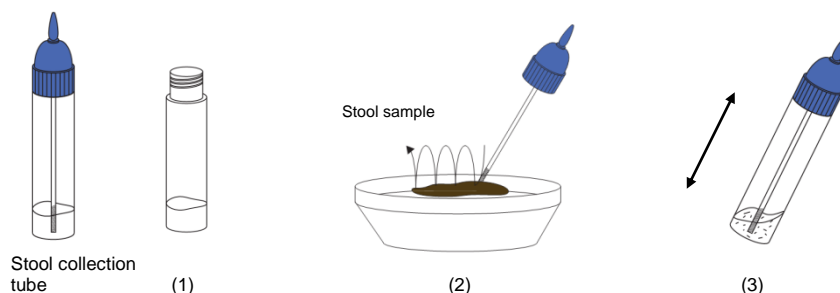
- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent. A new test must be used for each sample to avoid contamination errors.
- The tests should be discarded in a proper biohazard container after testing.
- Reagents contain preservatives. Avoid any contact with skin or mucous membrane. Consult safety data sheet, available on request.
- Components provided in the kit are approved for use in the CerTest *Crypto+Giardia* combo card test. Do not use any other commercial kit component.
- The presence of yellow lines in the results window (control line zone and test line zone), before using the test, is completely normal and does not imply failure of the test functionality.
- Follow Good Laboratory Practices, wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Stool samples should be collected in clean containers. The samples can be stored in the refrigerator (2-8°C) for 1-3 days prior to testing. For longer storage, maximum 1 month, the specimen must be kept frozen at -20°C. In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Homogenise stool sample as thoroughly as possible prior to preparation.

Specimen preparation (see illustration):

1. Take out the cap of the stool collection tube (1) and use the stick to pick up sufficient sample quantity. Then, introduce the stick once into 4 different parts of the stool sample (2) making sure that, at each insertion, only the stick's screw is covered with the sample to take the appropriate amount of faecal sample and add it to the stool collection tube. Any additional sample that exceeds the stick's screw could cause wrong results. For liquid samples, add approx. 125µL in the stool collection tube using a micropipette.
2. Close the tube with the diluent and stool sample. Shake the tube in order to assure good sample dispersion (3).



VERY IMPORTANT: Only fresh or fresh-frozen unpreserved and unfixed stool samples can be tested.

MATERIALS

MATERIALS PROVIDED

- CerTest *Crypto+Giardia* combo card tests
- Instructions for use
- Stool collection tubes with diluent

MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED

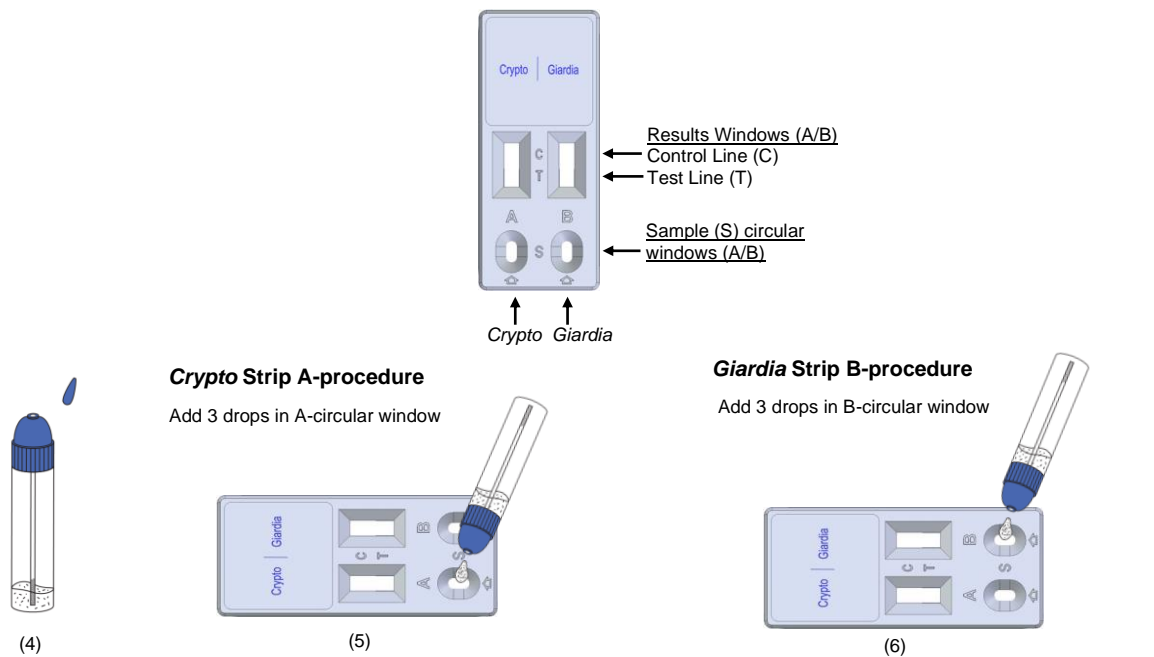
- Specimen collection container
- Disposable gloves
- Timer

TEST PROCEDURE

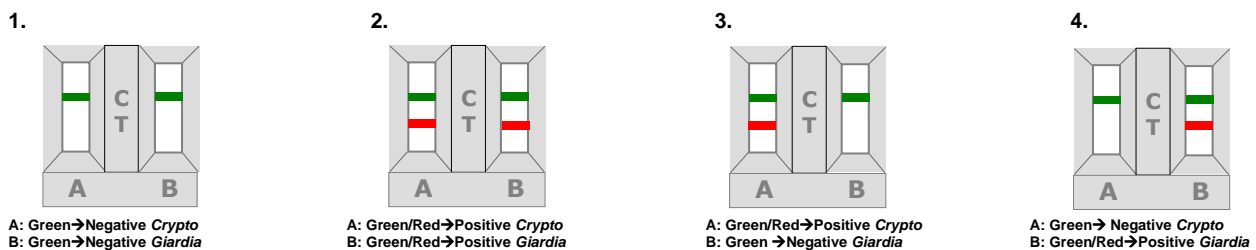
Allow tests, stool samples and controls to reach room temperature (15-30°C) prior to testing. Do not open pouches until the performance of the assay.

1. Proceed to shake the stool collection tube in order to assure good sample dispersion.
2. Remove CerTest *Crypto+Giardia* combo card test from its sealed bag just before using it.
3. Take the stool collection tube, cut the end of the cap (4) and dispense 3 drops in the circular window marked with the letter A (5) and 3 drops, using the same tube, in the circular window marked with the letter B (6). Avoid adding solid particles with the liquid.
4. **Read the results at 10 minutes.** Do not read the test result later than 10 minutes.

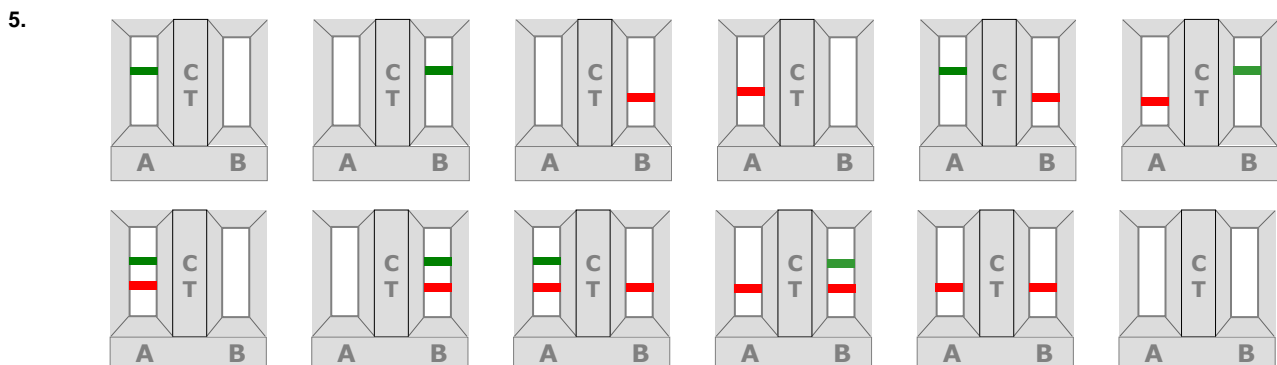
If the test does not run due to solid particles, stir the sample added in the sample window (S) with the stick. If it doesn't work, dispense a drop of diluent until seeing the liquid running through the reaction zone.



INTERPRETATION OF THE RESULTS (please refer to the illustration below)



INVALID RESULTS



CERTEST *Crypto+Giardia*

One Step test to detect *Cryptosporidium* and *Giardia* in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Cryptosporidium* y *Giardia* en formato cassette

	A (<i>Crypto</i>)	B (<i>Giardia</i>)	Interpretation of the results
1.	- GREEN	- GREEN	There is no <i>Cryptosporidium</i> or <i>Giardia</i> presence. No infection caused by <i>Cryptosporidium</i> and <i>Giardia</i> (α 1- <i>giardin</i> and/or CWP1).
2.	+ GREEN-RED	+ GREEN-RED	There is <i>Cryptosporidium</i> and <i>Giardia</i> presence. Infection caused by <i>Cryptosporidium</i> and <i>Giardia</i> (α 1- <i>giardin</i> and/or CWP1).
3.	+ GREEN-RED	- GREEN	There is <i>Cryptosporidium</i> presence. Infection caused by <i>Cryptosporidium</i> .
4.	- GREEN	+ GREEN-RED	There is <i>Giardia</i> presence. Infection caused by <i>Giardia</i> (α 1- <i>giardin</i> and/or CWP1).
5.	Any other result	Any other result	Invalid result either A or B, we recommend repeating the assay using the same sample with another test.

INVALID: Total absence of any control coloured line (GREEN) regardless the appearance or not of the test lines (RED). Insufficient specimen volume, incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control lines failure. Review the procedure and repeat the assay with a new test. If the symptoms or situation still persist, discontinue using the test kit and contact your local distributor.

NOTES ON THE INTERPRETATION OF RESULTS

The intensity of the red coloured bands in the test lines (T) in the results windows will vary depending on the concentration of antigens present in the specimen. However, neither the quantitative value nor the rate of increase in antigens can be determined by this qualitative test.

QUALITY CONTROL

Internal procedural controls are included in the test. The green lines appearing in the control lines (C) in the results windows are internal controls, which confirm sufficient specimen volume and correct procedural technique.

LIMITATIONS

1. The test must be carried out within 2 hours after opening the sealed bag.
2. Only fresh or fresh-frozen unpreserved and unfixed stool samples can be tested.
3. An excess of sample could cause wrong results (brown bands appear). Dilute the sample with the diluent and repeat the test.
4. The intensity of test line may vary from very strong at high antigens concentration to faint when the antigens concentration is close to the detection limit value of the test.
5. After one week of infection, the number of parasites in faeces is decreasing, making the sample less reactive. Stool samples should be collected within one week of the onset of symptoms.
6. CerTest *Crypto+Giardia* should be used only with samples from human faeces. The use of other samples has not been established. The quality of the test depends on the quality of the sample; proper faecal specimens must be obtained.
7. Positive results determine the presence of *Cryptosporidium* and/or *Giardia* (α 1-*giardin* and/or CWP1) in faecal samples; nevertheless, a positive result should be followed up with additional laboratory techniques (biochemical methods or microscopy) to confirm the results. A confirmed infection should only be made by a physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated and must be based in the correlation of the results with further clinical observations.
8. A negative result is not meaningful because of it is possible the antigens concentration in the stool sample is lower than the detection limit values. If the symptoms or situation still persist, a *Cryptosporidium* and/or *Giardia* determination should be carried out with another technique (for example microscopy).
9. Bloody stool samples can contain components that may cause non-specific reactions in the test. Every bloody stool sample whose result is positive should be followed up with other techniques of diagnosis to confirm the result.
10. Mucous stool samples may cause non-specific reactions in the test- Every mucous stool sample whose result is positive should be followed up with other techniques of diagnosis to confirm the result.

EXPECTED VALUES

Parasitic diseases are incriminated in causing more than 33% of global deaths of which intestinal parasitic infections are believed to take the major share. Lack of safe drinking water and environmental sanitation are largely responsible for more than 800 million expected cases of diarrheal diseases and 4.5 million associated deaths in many developing countries every year (3).

Morbidity and mortality due to diarrheal diseases in developing countries remain to be the main public health problems that need due attention. Although there could be many other causes of diarrhea, the enteric protozoa *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* have been

recognized as important causes of both out break-related and sporadic diarrhea among human beings. Both immunocompetent and immunocompromised individuals could be the victims of diarrheal diseases caused by these parasites.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Clinical sensitivity and specificity

An evaluation, with faecal samples, was performed comparing the results obtained by an immunochromatographic test (CerTest *Crypto+Giardia*, CerTest) vs the Evaluation Criteria. Evaluation criteria: two rapid test test were evaluated (CerTest *Crypto+Giardia*; CerTest (Crypto strip) and other rapid test from the competitor); the discrepant results were confirmed by qPCR technique (Viasure *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time Detection Kits (CerTest). The results were as follows:

		Evaluation Criteria (Crypto)		
		+	-	Total
IC test: CerTest <i>Crypto+Giardia</i> (Crypto)	+	33	0	33
	-	2	91	93
	Total	35	91	126

CerTest <i>Crypto+Giardia</i> (Crypto) vs Evaluation Criteria		
	Mean Value	95% CI (confidence interval)
Sensitivity	94.3%	80.8 – 99.3%
Specificity	100.0%	96.0 – 100.0%
PPV	100.0%	89.4 – 100.0%
NPV	97.8%	92.4 – 99.7%

An evaluation, with faecal samples, was performed comparing the results obtained by an immunochromatographic test (CerTest *Crypto+Giardia*, CerTest) vs the Evaluation Criteria. Evaluation criteria: three rapid test were evaluated (CerTest *Crypto+Giardia*, Certest (*Giardia* strip) and other two rapid test from the competitors); the discrepant results were confirmed by qPCR technique (Viasure *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time Detection Kits (CerTest). The results were as follows:

		Evaluation Criteria (Giardia)		
		+	-	Total
IC test: CerTest <i>Crypto+Giardia</i> (Giardia)	+	44	2	46
	-	1	79	80
	Total	45	81	126

CerTest <i>Crypto+Giardia</i> (Giardia) vs Evaluation Criteria		
	Mean Value	95% confidence interval
Sensitivity	97.8%	88.2–99.9%
Specificity	97.5%	91.4–99.7%
PPV	95.7%	85.2–99.5%
NPV	98.8%	93.2–100.0%

The results showed a high sensitivity and specificity to detect *Cryptosporidium* and *Giardia* ($\alpha 1$ -*giardin* and/or *CWP1*) using CerTest *Crypto+Giardia*.



CERTEST *Crypto+Giardia*

*One Step test to detect Cryptosporidium and Giardia in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de Cryptosporidium y Giardia en formato cassette*

Cross reactivity

An evaluation was performed to determine the cross reactivity of CerTest *Crypto+Giardia*; no cross reactivity against gastrointestinal pathogens, other organism, substances and/or faecal markers occasionally present in faeces:

For Strip A. *Crypto*

<i>Adenovirus</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Astrovirus</i>	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Bovine Haemoglobine</i>	<i>Escherichia coli</i> O:111	<i>Norovirus GI</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Calprotectin</i>	<i>Escherichia coli</i> O:026	<i>Norovirus GII</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Giardia</i>	<i>Pig Haemoglobine</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Clostridium difficile antigen GDH</i>	<i>Human Haemoglobine</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Streptococcus pneumococcal</i>
<i>Clostridium difficile Toxin A</i>	<i>Human Lactoferrin</i>	<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:3
<i>Clostridium difficile Toxin B</i>	<i>Human Transferrin</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:9
<i>Clostridium perfringens</i>			

For Strip B: *Giardia*

<i>Adenovirus</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Astrovirus</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Bovine Haemoglobine</i>	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Norovirus GI</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Calprotectin</i>	<i>Escherichia coli</i> O:111	<i>Norovirus GII</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Escherichia coli</i> O:026	<i>Pig Haemoglobine</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Clostridium difficile antigen GDH</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Clostridium difficile Toxin A</i>	<i>Human Haemoglobine</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Streptococcus pneumococcal</i>
<i>Clostridium difficile Toxin B</i>	<i>Human Lactoferrin</i>	<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:3
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Human Transferrin</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:9



ESPAÑOL**USO PREVISTO**

CerTest *Crypto+Giardia* combo card test es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la detección cualitativa simultánea de *Cryptosporidium* y *Giardia* (α 1-*giardin* y/o CWP1) en muestras de heces.

CerTest *Crypto+Giardia* combo card test ofrece un ensayo de cribado sencillo y de alta sensibilidad para realizar un diagnóstico presuntivo de criptosporidiosis y/o giardiasis.

INTRODUCCIÓN

Giardia y *Cryptosporidium* son parásitos que se encuentran en el agua. *Giardia* provoca una enfermedad intestinal llamada giardiasis. *Cryptosporidium* es responsable de una enfermedad muy similar llamada criptosporidiosis. Estos parásitos son una de las causas más frecuentes de enfermedades transmitidas a través del agua en humanos.

Giardia, un protozoo flagelado, habita en la parte superior del intestino delgado de su huésped y tiene dos estados principales en el ciclo de vida: trofozoítos que producen antígenos (α 1-*giardin*) y en forma de quiste que producen antígenos (CWP1). Después de que el huésped ingiere los quistes que son la etapa infecciosa, los trofozoítos emergen de los quistes en el duodeno y se unen a la mucosa en el intestino delgado. Se someten a división mitótica en el lumen intracelular, algunos se enquistan para protegerse y serán eliminados del huésped en las heces. El trofozoíto es la forma vegetativa y se replica en el intestino delgado.

La giardiasis es una enfermedad intestinal ocasionada por *Giardia intestinalis* (llamado también *Giardia lamblia* and *Giardia duodenalis*), un parásito microscópico unicelular que se encuentra en el intestino de las personas y los animales y se transmite a través de las heces de una persona o animal infectado. Este parásito está protegido por una cubierta exterior (quiste) que le permite sobrevivir fuera del cuerpo y en el medio ambiente durante largos periodos de tiempo. Entre los síntomas más comunes figuran diarrea, deposiciones acuosas, calambres y trastornos estomacales. Estos síntomas comienzan 1-2 semanas tras la infección, y pueden durar 2-6 semanas en individuos sanos. A veces los síntomas pueden prolongarse y provocar a una pérdida de peso y deshidratación aun cuando algunas personas no presentan síntomas. En personas inmunodeprimidas (con HIV/SIDA, enfermos de cáncer y pacientes transplantados) o en personas mayores pueden aparecer complicaciones que les conduzcan a una enfermedad grave e incluso la muerte.

Cryptosporidium parvum es el causante más frecuente de procesos diarreicos en los países en desarrollo. Este parásito se localiza en la mayoría de las infecciones patógenas entéricas, su forma infectiva se transmite por vía feco-oral. Algunos de los síntomas más comunes de la criptosporidiosis son diarrea acuosa, dolores agudos de estómago, pérdida de peso, náuseas y alguna vez fiebre.

FUNDAMENTO DEL TEST

CerTest *Crypto+Giardia* es una prueba cualitativa inmunocromatográfica para la detección de *Cryptosporidium* y *Giardia* (α 1-*giardin* y/o CWP1) antígenos en muestras de heces. La tira B (*Giardia*) detecta trofozoítos y quistes.

Tira A consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a *Cryptosporidium* en la línea de test (T), en la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos de la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a *Cryptosporidium*) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno verde, formando dos complejos coloreados conjugados.

Tira B consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a *Giardia* en la línea de test (T), de la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos de la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a *Giardia*) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno verde, formando dos complejos coloreados conjugados.

Si la muestra es *Cryptosporidium* positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-*Cryptosporidium*-microesferas rojas de látex) en la tira A, y si la muestra es *Giardia* positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-*Giardia*-microesferas rojas de látex) en la tira B, los cuales fueron secados previamente en el material absorbente. Esta mezcla avanza por capilaridad a través de la membrana. Conforme la muestra va migrando también lo hacen los complejos conjugados. Los anticuerpos anti-*Cryptosporidium* presentes en la membrana de la tira A (línea de test) y los anticuerpos anti-*Giardia* presentes en la membrana de la tira B (línea de test) capturarán el complejo coloreado del test y la línea roja aparecerá en ambas tiras. Estas líneas se usarán para interpretación del resultado.

Si la muestra es negativa, no hay presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* o los antígenos están presentes en una concentración inferior al límite de detección y no se produce reacción con ningún complejo coloreado rojo. Los anticuerpos anti-*Cryptosporidium* y *Giardia* presentes en las membranas (líneas de test) no capturarán el antígeno-complejo coloreado rojo (no formado) y no aparecerán las líneas rojas.

Independientemente de que la muestra sea positiva o no, en ambas tiras, la mezcla continuará moviéndose a través de las membranas hacia los anticuerpos inmovilizados frente a la proteína específica localizados en las líneas de control. Estos anticuerpos anti-proteína específica presentes en ambas membranas capturarán el complejo conjugado de control y las líneas de control verdes siempre aparecerán. La aparición de estas líneas se utiliza: 1) para verificar que se ha añadido el volumen de muestra suficiente, 2) que el flujo ha sido apropiado y 3) como control interno de los reactivos.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El producto debe ser almacenado entre 2 y 30°C en su envase original sellado, para conseguir un óptimo funcionamiento hasta la fecha de caducidad impresa en el envase. No debe abrirse hasta el momento de su uso. No congelar.

PRECAUCIONES

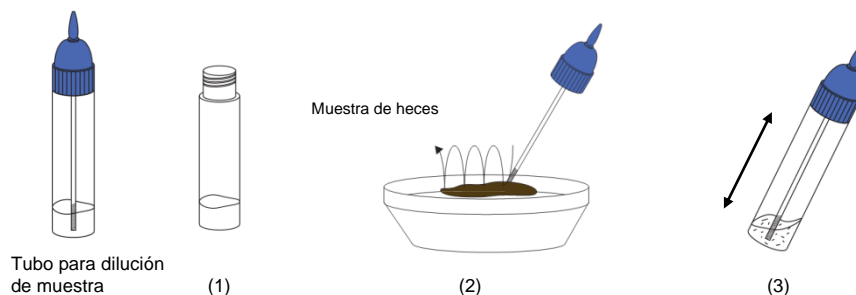
- Sólo para uso profesional *in vitro*.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso. Un nuevo test deberá utilizarse para cada muestra para evitar errores de contaminación.
- Los tests usados deben ser gestionados como residuos sanitarios (contenedor de residuos sanitarios).
- Los reactivos contienen conservantes. Debe evitarse cualquier contacto con la piel o las mucosas. Consultar fichas de seguridad, disponibles bajo petición.
- Los componentes proporcionados con el kit son aprobados para su uso con CerTest *Crypto+Giardia* combo card test. No se deben usar con componentes de otros kits comercializados.
- La presencia de líneas amarillentas en la ventana de resultados (zona línea de control y zona línea de test), antes de utilizar el test, es completamente normal y no supone fallo de funcionalidad del test.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio, llevar ropa de protección adecuada, usar guantes desechables, gafas de protección y mascarilla. No comer, ni beber o fumar en la zona de trabajo.

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Las muestras deben ser recogidas en un recipiente limpio. Las muestras se deben conservar en frío (2-8°C), durante 1-3 días, hasta el momento de utilizarlas. Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado, como máximo 1 mes, deben mantenerse congeladas a -20°C. En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. Homogenizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Preparación de la muestra (ver dibujo):

1. Abrir el tubo para dilución de muestra (1) y con ayuda del palito tomar suficiente cantidad de muestra de las heces recogidas. Para ello se introducirá el palito una sola vez en 4 zonas distintas de la muestra (2), asegurándose de que, en cada inserción, la hélice del palito se cubra con la muestra para tomar la cantidad adecuada de heces y posteriormente se introducirá la muestra en el tubo para dilución de muestra. Si se añade cantidad de muestra adicional que sobrepase la hélice del palito se podrían originar resultados erróneos. Para muestras líquidas, añada aprox. 125µL en el tubo para dilución utilizando una micropipeta.
2. Cerrar el tubo que contiene la muestra y el diluyente. Agitarlo para facilitar la dispersión de la muestra (3).



MUY IMPORTANTE: Utilizar únicamente muestras frescas o muestras frescas congeladas sin conservantes ni fijadores.

MATERIALES

MATERIALES SUMINISTRADOS

- CerTest *Crypto+Giardia* combo card tests
- Instrucciones de uso
- Tubos para dilución de muestra con diluyente

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Recipiente para recogida de muestras
- Guantes desechables
- Cronómetro

PROCEDIMIENTO

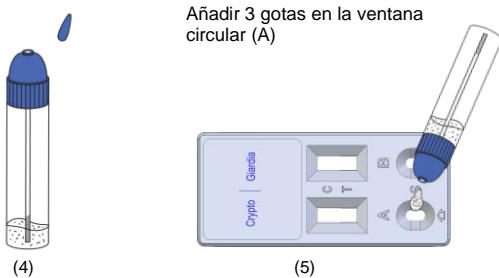
Previamente los tests, las muestras y los controles se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30°C). No abrir los envases hasta el momento de la prueba.

1. Agitar el tubo para dilución de muestra para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar el test CerTest *Crypto+Giardia* de su envase antes de utilizarlo.
3. Tomar el tubo para dilución de muestra, cortar la punta del tapón (4) y añadir 3 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra A (5), y añadir 3 gotas, con el mismo tubo, en la ventana circular marcada con la letra B (6), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
4. **Leer el resultado a los 10 minutos.** No leer el resultado superados los 10 minutos.

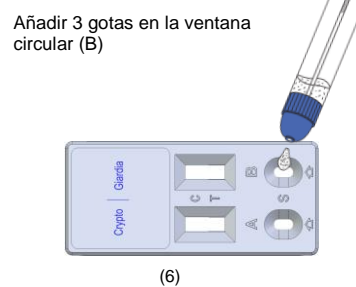
Si se da el caso de que el test no funciona debido a la presencia de partículas sólidas, agitar con el palito la muestra en la ventana (S). Si no funciona, añadir una gota de diluyente hasta que se vea avanzar el líquido por la zona de resultados.



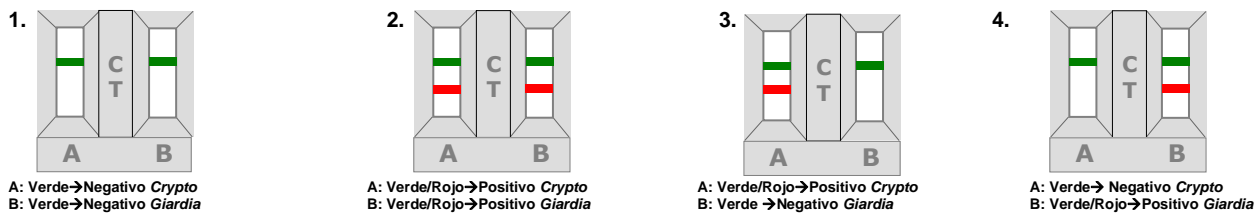
Procedimiento para la tira A de *Crypto*



Procedimiento para la tira B de *Giardia*

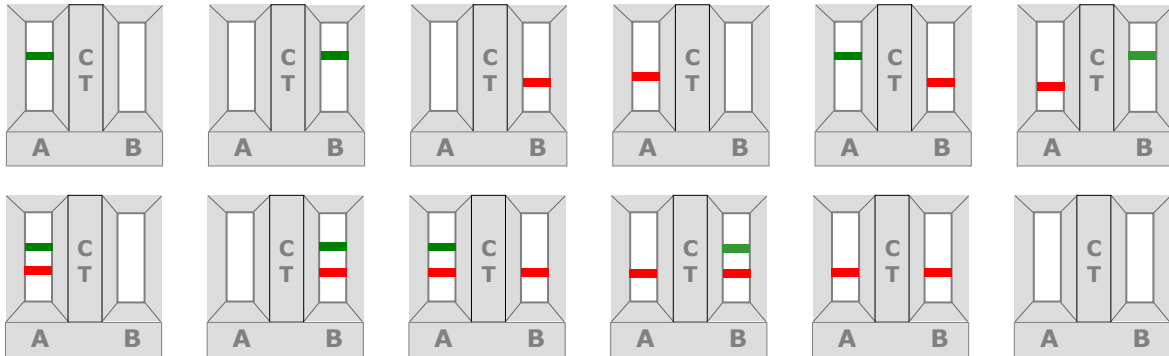


INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS (por favor, fíjese en el siguiente dibujo)



RESULTADOS INVÁLIDOS

5.



	A (<i>Crypto</i>)	B (<i>Giardia</i>)	Interpretación de los resultados
1.	- VERDE	- VERDE	No hay presencia de <i>Cryptosporidium</i> o <i>Giardia</i> (α 1-giardin y/o CWP1). No hay infección causada por <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i> .
2.	+ VERDE-ROJO	+ VERDE-ROJO	Hay presencia de <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i> (α 1-giardin y/o CWP1). Hay infección causada por <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i> .
3.	+ VERDE-ROJO	- VERDE	Hay presencia de <i>Cryptosporidium</i> . Hay infección causada por <i>Cryptosporidium</i> .
4.	- VERDE	+ VERDE-ROJO	Hay presencia de <i>Giardia</i> (α 1-giardin y/o CWP1). Hay infección causada por <i>Giardia</i> .
5.	Cualquier otro resultado	Cualquier otro resultado	Cualquier resultado inválido en A o en B: se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.

INVÁLIDO: Cuando alguna línea de control (VERDE) no aparece, independientemente de que aparezcan o no las líneas de test (ROJA). Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido son: un volumen insuficiente de muestra, una forma de proceder incorrecta o un deterioro de los reactivos. Si ocurriera esto, debe revisar el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo test. Si los síntomas o la situación persisten, debe dejar de utilizar la prueba y contactar con su distribuidor.

OBSERVACIONES

La intensidad de las líneas de color rojo en las líneas de test (T) en las ventanas de resultados variará dependiendo de la concentración de antígenos presente en la muestra. Sin embargo, esta prueba es cualitativa, por lo que, ni la cantidad ni la tasa de aumento de antígenos pueden ser determinados por la misma.

CONTROL DE CALIDAD

Los controles internos de funcionamiento vienen incluidos en la prueba. Las líneas verdes que aparecen en las líneas de control (C) en las ventanas de resultados son los controles internos del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

LIMITACIONES

- Una vez abierto, el test no debe usarse después de 2 horas.
- Utilizar únicamente muestras frescas o muestras frescas congeladas sin conservantes ni fijadores.
- Un exceso de muestra de heces puede dar resultados erróneos, dando líneas no muy definidas de color pardo, que no tienen ningún valor diagnóstico. Diluir la muestra con el diluyente y repetir el test.
- La intensidad de la línea de test puede variar desde muy fuerte a alta concentración de antígenos a débil cuando la concentración de antígenos está cerca del valor del límite de detección del test.
- Después de una semana de infección la presencia de parásitos eliminados en heces disminuye considerablemente por lo que es probable una menor concentración en la muestra. Se debe tomar la muestra de heces dentro de la primera semana de aparición de los síntomas.
- CerTest *Crypto+Giardia* debería utilizarse sólo con muestras de heces humanas. El uso de otras muestras no ha sido determinado. La calidad del test depende de la calidad de la muestra; por lo que se debe realizar una adecuada toma de muestras fecales.

7. Los resultados positivos determinan la presencia de *Cryptosporidium* y/o *Giardia* (α 1-*giardin* y/o CWP1) en muestras de heces; sin embargo, un resultado positivo debería ser contrastado con otras técnicas de laboratorio (métodos bioquímicos o por microscopía) para confirmar los resultados. La infección debe confirmarse por un especialista o médico cualificado, tras evaluar las pruebas clínicas y los hallazgos de laboratorio teniendo en cuenta la correlación que puede existir con todas las observaciones clínicas.
8. Un resultado negativo no se debe considerar como concluyente, puede darse que la concentración de antígenos en la muestra de heces sea inferior a los valores del límite de detección. Si los síntomas o la situación persisten, la determinación de *Cryptosporidium* y/o *Giardia*, se debería realizar la prueba con otra técnica (por ejemplo microscopía).
9. Las muestras de heces sanguinolentas contienen componentes que podrían causar reacciones inespecíficas en el test. Toda muestra sanguinolenta cuyo resultado es positivo debe confirmarse con otras técnicas.
10. Muestra de heces mucosas podrían provocar reacciones inespecíficas en el test. Toda muestra de heces mucosas cuyo resultado sea positivo debería ser contrastado con otras técnicas diagnósticas para confirmar el resultado.

VALORES ESPERADOS

Las enfermedades parasitarias causan más del 33% del total de muertes, de las cuales se cree que las infecciones parasitarias del intestino constituyen la mayor parte. Una falta de agua potable y de salubridad medioambiental son responsables de más 800 millones de casos esperados de enfermedades diarreicas y de 4.5 millones de muertes asociadas en muchos países desarrollados cada año (3).

La morbilidad y mortalidad debida a enfermedades diarreicas en países desarrollados continúan siendo los principales problemas de salud pública que necesitan atención. Aunque puede haber muchas otras causas de diarrea, los protozoos entéricos *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* han sido reconocidos como causas importantes de un brote relacionado y de diarrea esporádica entre seres humanos. Ambos individuos inmunocompetentes e inmunocomprometidos pueden ser las víctimas de enfermedades diarreicas causadas por estos parásitos.

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

Sensibilidad y especificidad clínica

Se llevó a cabo una evaluación, con muestras de heces. Comparando los resultados obtenidos con un test inmunocromatográfico (CerTest *Crypto+Giardia*, CerTest) vs un Criterio de evaluación. Criterio de evaluación: dos test rápidos fueron evaluados (CerTest *Crypto+Giardia* (Tira *Crypto*), CerTest y otro test rápido de la competencia); los resultados discrepantes fueron confirmados por la técnica qPCR (Viasure *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time Detection Kits (CerTest). Los resultados se muestran a continuación:

IC test: CerTest <i>Crypto+Giardia</i> (<i>Crypto</i>)	Criterio Evaluación (<i>Crypto</i>)			
		+	-	Total
+		33	0	33
-		2	91	93
Total		35	91	126

CerTest <i>Crypto+Giardia</i> (<i>Crypto</i>) vs Criterio Evaluación		
	Valor Medio	95% Intervalo de confianza
Sensibilidad	94.3%	80.8 – 99.3%
Especificidad	100.0%	96.0 – 100.0%
VPP	100.0%	89.4 – 100.0%
VPN	97.8%	92.4 – 99.7%

Se llevó a cabo una evaluación, con muestras de heces, comparando los resultados obtenidos con un test inmunocromatográfico (CerTest *Crypto+Giardia*, CerTest) vs un Criterio de Evaluación. Criterio de evaluación: tres test rápidos fueron evaluados (CerTest *Crypto+Giardia* (tira *Giardia*), CerTest vs otros dos test rápidos de la competencia), los resultados discrepantes fueron confirmados mediante la técnica qPCR (Viasure *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time Detection Kits (CerTest) Los resultados se muestran a continuación:



CERTEST *Crypto+Giardia*

One Step test to detect *Cryptosporidium* and *Giardia* in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Cryptosporidium* y *Giardia* en formato cassette

		Criterio Evaluación (<i>Giardia</i>)		
		+	-	Total
IC test: CerTest <i>Crypto+Giardia</i> (<i>Giardia</i>)	+	44	2	46
	-	1	79	80
	Total	45	81	126

CerTest <i>Crypto+Giardia</i> (<i>Giardia</i>) vs Criterio Evaluación		
	Valor Medio	95% intervalo de confianza
Sensibilidad	97.8%	88.2– 99.9%
Especificidad	97.5%	91.4 – 99.7%
VPP	95.7%	85.2 - 99.5%
VPN	98.8%	93.2 – 100.0%

Los resultados mostraron que CerTest *Crypto+Giardia* presenta una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Cryptosporidium* y *Giardia* ($\alpha 1$ -*giardin* y/o CWP1).

Reacciones cruzadas

Se realizó una evaluación para determinar posibles reacciones cruzadas de CerTest *Crypto+Giardia*; no se detectó reacción cruzada con patógenos gastrointestinales, otros organismos, sustancias y/o marcadores fecales ocasionalmente presentes en las heces:

Para la tira A: *Crypto*

<i>Adenovirus</i>	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Transferrina humana</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Astrovirus</i>	<i>Escherichia coli</i> O:111	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Calprotectin</i>	<i>Escherichia coli</i> O:026	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Giardia</i>	<i>Norovirus GI</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Norovirus GII</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH	<i>Hemoglobina bobina</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Clostridium difficile</i> Toxin A	<i>Hemoglobina de cerdo</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Streptococcus pneumococcal</i>
<i>Clostridium difficile</i> Toxin B	<i>Hemoglobina humana</i>	<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:3
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Lactoferrina humana</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:9
<i>Entamoeba histolytica</i>			

Para la tira B: *Giardia*















<i>Adenovirus</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Astrovirus</i>	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Calprotectin</i>	<i>Escherichia coli</i> O:111	<i>Norovirus GI</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Escherichia coli</i> O:026	<i>Norovirus GII</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Clostridium difficile</i> Toxin A	<i>Hemoglobina bovina</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Streptococcus pneumococcal</i>
<i>Clostridium difficile</i> Toxin B	<i>Hemoglobina humana</i>	<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Transferrina humana</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Hemoglobina de cerdo</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:3
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Lactoferrina humana</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:9



REFERENCES/BIBLIOGRAFÍA

- MARSHALL, M.M., et al., "Waterborne Protozoan Pathogens", *Clinical Microbiology Review*, Jan. 1997, pp 67-85.
- DYLAN R. PILLAI and KEVIN C, KAIN, "Immunochromatographic Strip-Based Detection of *Entamoeba histolytica*-*E. dispar* and *Giardia lamblia* Coproantigen". *Journal of Clinical Microbiology*, Sept. 1999, Vol. 37, No 9, p. 3017-3019.
- LYNNE S. GARCIA et al., "Commercial Assay for Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* Antigens in Human Fecal Specimens by Rapid Solid-Phase Qualitative Immunochromatography", *Journal of Clinical Microbiology*, Jan. 2003, Vol. 41, No. 1, p. 209-212.
- ADAM RODNEY. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(3):447-475. doi:10.1128/CMR.14.3.447-475.2001).
- GAÉTAN FAUBERT. Immune Response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev*. 2000; 13(1): 35-54. 0893-8512/00/\$04.00+.

SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS/SÍMBOLOS PARA REACTIVOS Y PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

 IVD	<i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Keep dry Almacenar en lugar seco	 Use by Fecha de caducidad	 Manufacturer Fabricante	 LOT	Batch code Número de lote	
 	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso	 Temperature limitation Limitación de temperatura	 Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	 DIL	Sample diluent Diluyente de muestra	 REF	Catalogue number Número de referencia
 	Do not re-use No reutilizar	 CE	CE marking/ Marcado CE				



CerTest
BIOTEC S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es



F-368 rev00