



Instructions for use
Instructions d'utilisation
Instrucciones de uso
Istruzioni per l'uso
Instrukcja obsługi

NADAL[®] Giardia-Crypto Combo Test (test cassette)

REF 521007

Version A 1.0

2012-09-07

CE

IVD

nal von minden GmbH

Carl-Peschken-Straße 9
47441 Moers
Germany

Friedenstraße 32
D-93053 Regensburg
Germany

Tel.: 0049 941 29010-0
Fax: 0049 941 29010-50

info@nal-vonminden.com
www.nal-vonminden.com

Directors:
Sandra von Minden
Roland Meißner
Thomas Zander

Commercial reg.: HRB 5679
VAT-ID-Nr.: DE 189 016 086
Tax-No: 244/133/00130

IBAN: DE98750500000840017073
BIC: BYLADEM1RBG
Bank: Sparkasse Regensburg

Point of Care Tests

Lab Assay Products

Lab Services

About us

EN	Instructions for use.....	3
FR	Instructions d'utilisation.....	6
E	Instrucciones de uso.....	9
I	Istruzioni per l'uso.....	12
PL	Instrukcja obsługi.....	15
	Symbols.....	19

1. Intended Use

The NADAL® Giardia-Crypto Combo test cassette by nal von minden is a qualitative chromatographic immunoassay rapid test for the detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* antigens in stool samples. The test is intended for professionals in in-vitro diagnostic use only.

2. Clinical Significances

Cryptosporidium is a gastrointestinal protozoan parasite that infects humans and animals, causing a disease known as intestinal, tracheal and pulmonary cryptosporidiosis.

Giardia intestinalis, also called *Giardia lamblia*, is a gastrointestinal protozoan parasite causing a clinical picture that ranges from the symptom-free carrier to cases of acute or chronic diarrheic disease, especially in children. Both parasites are found throughout the world, particularly in areas with deficient sanitary conditions.

As does *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* infects through ingestion of its cysts, which can remain viable even in chlorinated water. When cysts reach the duodenum, each one releases up to 4 flagellated trophozoites (invasive form) that colonize the cells in the duodenum and proximal jejunum. The life cycle of *Cryptosporidium* is very short; each generation can develop and mature in 12-24 hours. This, together with its self-infectious character, leads to the intestinal tract being infected by a great number of parasites in only a few days. Diarrhoea, weight loss and abdominal cramps are the clinical symptoms of this disease, which can produce an electrolyte imbalance in immunosuppressed individuals. Pulmonary and tracheal cryptosporidiosis is associated with cough and fever, often accompanied by intestinal alterations. These symptoms generally develop 4-6 days after infection, although they can appear at any moment at 2-10 days.

In the case of *Giardia lamblia*, symptoms appear 1-3 weeks after contagion, following an incubation period of approximately 8 days. The most frequent presentation is characterized 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. In children, digestive function alterations are common. There are persistent symptoms, such as poor sugar absorption (particularly disaccharides like sucrose and lactose), fats and liposoluble vitamins. Lactose intolerance is common following acute infection and relapses or re-infection can appear. In rare cases, the trophozoites invade the intestinal wall, causing inflammatory diarrhoea and fever. Whether they produce toxic substances has not been documented.

3. Principle of the Test

The NADAL® Giardia-Crypto Combo test cassette is based on the immunological capture of colored microparticles as they pass through a membrane on which the monoclonal antibody has been immobilized.

NADAL® Giardia-Crypto Combo test cassette use monoclonal *Cryptosporidium parvum*- and *Giardia lamblia* specific antibodies that detect all forms of the parasites' life cycle.

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

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

4. Reagents and Materials Supplied

The kit has the following components:

- 10 NADAL® Giardia-Crypto Combo test cassettes
- 10 Plastic tubes containing buffer solution
- 1 instruction sheet

Required Materials (not included in the kit):

- Stop watch or timer
- Pipettes that can be graduated (for liquid stool samples)
- Pipette tips (for liquid stool samples)

5. Storage & Stability

The NADAL® Giardia-Crypto Combo test 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 foil pouch and the outer package label.

6. Warnings and Precautions

- Patient samples (stool) may contain infectious agents and should be treated and discarded as potentially dangerous biological materials.
- The buffer contains sodium azide as an antimicrobial agent. Avoid direct contact with skin and mucosa. Discard appropriately. Do not use the buffer if there are indications of contamination or precipitation.

- Do not store or prepare food, eat, drink or smoke in the area where the reagents and samples are handled.
- Wear disposable gloves when handling the samples. Wash your hands thoroughly when you have finished working.
- Do not exchange components from kits with different LOT numbers.
- Use all the reagents only *in vitro*.
- 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.
- Do not use kit components after the expiration dates.
- If the package is broken, the product can still be used as long as none of the components have been damaged.
- It is important to add the correct sample amount (4-5 drops of suspension). If less than indicated is used, the chromatography may not occur because the sample may not reach the reaction area; if there is too much, brown lines may appear instead of red and blue ones.
- The used product should be discarded as indicated by current legislation.
- Do not use the test if a colored line appears in the result area before you start to use it.
- It is important to take the appropriate amount of stool sample: 30-50 mg of solid stool or approx. 100 ul of liquid stool. An excessive sample amount prevents correct chromatography.

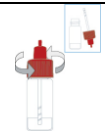
7. Specimen Collection and Preparation

Stool samples should be collected in an appropriate sterile container as soon as possible after symptom onset. The sample should be representative, if possible. The samples can be stored in the refrigerator (at approximately 4°C) for 1-2 days before being analyzed. To conserve samples for a longer period, store them in a freezer at -20°C, with no further handling. In this case, the sample must be completely defrosted, taken to room temperature and homogenized before analysis.

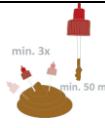
8. Procedure of the Test

Before testing: please let reach the tests and specimen room temperature (15 – 30°C). After opening the foil pouch the tests should be performed quickly, as they are sensitive to humidity.

1. Unscrew the vial cap carefully, so as not to spill the extraction buffer.

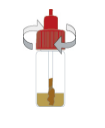


2. Collect a sufficient amount of fecal matter (30-50 mg) with the end of the applicator. Take sample from three different sample sites at least, in order to get a sample as much representative as possible.



If the stool is liquid, collect 100 microliters with the help of a pipette and transfer to the vial.

3. Introduce the applicator with the specimen into the vial. Screw the cap on tightly and **shake** vigorously to ensure a homogenous mixture.



4. Take the reaction device out of the aluminum pouch. Discard the small bag of desiccant; it is not used during the test, as its only purpose is to protect the test against moisture.



Break the upper end of the vial.

5. Add **4 or 5 drops** to the sample area of the reaction device (round window marked with an arrow). Do not add solid particles along with the liquid.



6. Wait exactly **10 minutes** and then read and interpret the results.

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



9. Interpretation of the Results

To interpret the results please look at the line pattern that has formed in the result window marked with C und T1 and T2.



Positive Result:

Cryptosporidium:

A **GREEN** control line C and a separate **BLUE** test line T1 appear in the result window. The intensity can vary according to the antigen concentration present.



Giardia:

A **GREEN** control line C and a separate **RED/PINK** test line T2 appear in the result window. The intensity can vary according to the antigen concentration present.



Negative Result:

There is only a single **GREEN** control line C in the result window. This line should always appear.



Invalid Result:

The test is **INVALID** if no green control line appears because the procedure was not followed correctly, the reagents have deteriorated or because an incorrect amount of sample was added. Repeat the test with a new test cassette.



Note:

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

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

10. Quality control

The test is invalid if no green line appears, whether because the test was not performed properly or the reagents have deteriorated. If this happens, repeat the analysis, following the work 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.

11. Limitations

- Final diagnosis should not be based on only the result from one test. The diagnosis should be established by the correlation of test results with other appropriate data and with clinical symptoms.
- The NADAL® Giardia-Crypto Combo test should be used only for detecting *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* antigens in stool samples.
- This is a qualitative test; no quantitative interpretation of the result should be made with respect to the intensity of the positive line.
- A large number of samples were evaluated to ensure proper test functioning. The correlation of results with other techniques (ELISA) was excellent. However, interferences in the test performance cannot be excluded.
- If there is too much sample, brown lines may appear instead of red and blue ones, or there may be no test and control lines because chromatography is not produced correctly. 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.
- No cross reaction with other substances has been observed during test evaluation. A negative result does not totally exclude the possibility of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* infection. The importance of the results should be evaluated in relation to the patient's clinical symptoms.
- The analysis of some samples can produce lines of imprecise color, caused by negative samples in the majority of the cases. The test should be repeated if lines of indeterminate color appear. If the same result is obtained again, the analysis should be performed with another analytic method.

12. Performance Characteristics

DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

Assay 1 - A CE-marked ELISA product is taken as the product of reference. NADAL® Giardia-Crypto Combo test was evaluated against ELISA for detecting *Cryptosporidium* antigens.

The results were as follows:

		Ridascreen Crypto ELISA		Total
		+	--	
NADAL® Crypto	+	19	0	19
test cassette	--	8	53	61
Total		27	53	80

Concordance percent: 100% [(19+53)/80] = 90,0 %.

Estimated sensitivity concordance: 100% [19/(19+8)] = 70,4 % *

Estimated specificity concordance: 100% [53/(0+53)] > 99,9 %

*The 8 divergent samples were analyzed by PCR to determine the presence of *Cryptosporidium* DNA, with a negative result.

Assay 2 - Parasite detection via microscope was taken as the technique of reference. NADAL® Giardia-Crypto Combo test was evaluated against detecting *Cryptosporidium* antigens under the microscope.

The results were as follows:

		Microscopy		Total
		+	--	
NADAL® Crypto	+	15	0	15
test cassette	--	0	54	54
Total		15	54	69

Concordance percent: 100% [(15+54)/69] > 99,9 %.

Estimated sensitivity concordance: 100% [15/(15+0)] > 99,9 %

Estimated specificity concordance: 100% [54/(0+54)] > 99,9 %

Assay 3 - A CE-marked ELISA product is taken as the product of reference. NADAL® Giardia-Crypto Combo test was evaluated against ELISA for detecting *Giardia* antigens.

The results were as follows:

		Ridascreen Giardia ELISA		Total
		+	--	
NADAL® Giardia	+	26	0	26
test cassette	--	1	53	54
Total		27	53	80

Concordance percent: 100% [(26+53)/80] = 98,8 %.

Estimated sensitivity concordance: 100% [26/(26+1)] = 96,3 % *

Estimated specificity concordance: 100% [53/(0+53)] > 99,9 %

Assay 4 - Parasite detection via microscope was taken as the technique of reference. NADAL® Giardia-Crypto Combo test was evaluated against detecting *Giardia* antigens under the microscope.

The results were as follows:

		Microscopy		Total
		+	--	
NADAL® Giardia	+	15	1	16
test cassette	--	0	53	53
Total		15	54	69

Concordance percent: 100% [(15+53)/69] > 98,5 %.

Estimated sensitivity concordance: 100% [15/(15+0)] > 99,9 %

Estimated specificity concordance: 100% [53/(1+53)] > 98,1 %

REPEATABILITY- INTRA-ASSAY PRECISION

Five replicas of each concentration of the sensitivity curve were assayed with one lot, obtaining the same results.

REPRODUCIBILITY

INTER-DAY PRECISION

Using 1 product lot, 4 replicas of the sensitivity curve were performed over 10 consecutive days. Only a difference less than a 1:2 dilution was found, which is acceptable and tolerable for immunochromatography technique.

INTER-LABORATORY PRECISION

Three different laboratory technicians assayed those same samples, maintaining elevated precisions and concordances. Only a difference of a 1:2 dilution was found, which is acceptable and tolerable for immunochromatography assay.

INTER-LOT PRECISION

A sensitivity curve was performed in duplicate with 3 product lots. The analyses were performed by the same person on the same day. Only a difference less than a 1:2 dilution was found, which is acceptable and tolerable for immunochromatography technique.

HOOK EFFECT

No known concentration standard was available. However, the analyses of the sensitivity curve based on the maximum concentration possible of the internal standard did not show the existence of any Hook effect.

INTERFERING SUBSTANCES

The substances indicated in the table, at the concentrations specified, did not interfere with the result. One lot was used to carry out 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)
Metronidazole	1,2 mg/ml

INTERFERING MICROORGANISMS

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

Bacteria/Parasites/Virus

Adenovirus
Astrovirus
Blastocystis hominis
Campylobacter jejuni
Chilomastix mesnili
Endolimax nana
Entamoeba coli
Giardia lamblia
Helicobacter pylori
huevos de *Taenia spp*
Iodamoeba bütschlii
Rotavirus

13. References

1. Clark D.P. "New insights into human Cryptosporidiosis". *Clinical Microbiology Reviews* (1999). Vol 12, nº 14, p. 554-563.
2. Garcia L.S. y Shimizu R.Y. "Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC combination rapid solidphase qualitative immunochromatographic assay". *Journal of Clinical Microbiology* (2000). Vol 38, nº 3, p. 1267-1268.
3. Sharp S.E. et al. "Evaluation of the Triage Micro Parasite Panel for detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* in patient stool specimens". *Journal of Clinical Microbiology* (2001). Vol 39, nº 1, p. 332-334.
4. Katanik M.T. et al. "Evaluation of ColorPac Giardia/Cryptosporidium rapid assay and ProSpecT Giardia/Cryptosporidium microplate assay for detection of Giardia and Cryptosporidium in fecal specimens". *Journal of Clinical Microbiology* (2001). Vol 39, nº 12, p. 4523-4525.

Rev: 2012-06-18 SW

1. Domaine d'application

Le test NADAL® Giardia-Crypto Combo est un test rapide par immunochromatographie pour la détection qualitative d'antigènes de *Cryptosporidium* et de *Giardia* dans les selles. Le test est réservé au diagnostic in vitro professionnel.

2. Signification diagnostique

Le *Cryptosporidium* est un parasite protozoaire gastro-intestinal, qui infecte les humains et les animaux, provoquant une maladie appelée cryptosporidiose intestinale, trachéale et pulmonaire.

Le *Giardia intestinalis*, également appelé *Giardia lamblia*, est un parasite protozoaire gastro-intestinal de diverses espèces (mammifères, volailles, etc.) provoquant un état allant de porteur asymptomatique jusqu'à une maladie diarrhéique aiguë ou de longue durée, notamment chez l'enfant. Les deux parasites se trouvent dans le monde entier, notamment dans les zones présentant de mauvaises conditions sanitaires.

Le *Cryptosporidium* et *Giardia lamblia* provoquent une infection à travers l'ingestion de ses kystes, qui peuvent rester viables même dans l'eau chlorée. En arrivant au duodénum, chaque kyste libère jusqu'à 4 trophozoïtes flagellés (forme invasive) qui colonisent les cellules du duodénum et du jéjunum proximal.

Le cycle vital du *cryptosporidium* est très rapide, et chaque génération peut se développer et arriver à maturité en 12- 24 heures. Ceci, en plus de son caractère auto-infectieux, implique l'infection du tractus intestinal en quelques jours à peine par un grand nombre de parasites. Les symptômes cliniques de la maladie sont la diarrhée, la perte de poids et des crampes abdominales. Chez les personnes ayant subi une immunosuppression, cela peut conduire à un déséquilibre électrolytique. La cryptosporidiose pulmonaire et trachéale est associée à de la toux et de la fièvre, souvent accompagnées d'altérations intestinales. Ces symptômes se développent généralement entre 4 et 6 jours après l'infection, bien qu'ils puissent également apparaître à tout moment entre 2 et 10 jours après.

Les symptômes de *Giardia lamblia* apparaissent entre 1 et 3 semaines après la contagion et se déclenchent après une période d'incubation de près de 8 jours. La forme de présentation la plus fréquente se caractérise par une diarrhée, une perte de poids, une douleur abdominale de type colique et un arrêt de la croissance et du développement. Le début des symptômes peut être brutal ou progressif ; la maladie peut être autolimitée ou produire un cycle de diarrhée grave avec une mauvaise absorption intestinale. Chez l'être humain, les altérations des fonctions digestives sont courantes chez les enfants présentant des symptômes persistants, tels qu'une mauvaise absorption des sucres (notamment les disaccharides tels que le saccharose et le lactose), des graisses et des vitamines liposolubles. L'intolérance au lactose est courante après l'infection aiguë et peut faire penser à une rechute ou à une réinfection. Il est rare que les trophozoïtes envahissent les parois intestinales et provoquent une diarrhée inflammatoire et de la fièvre, et il n'est pas non plus référencé qu'ils produisent des substances toxiques.

3. Principe du test

Le test NADAL® Giardia-Crypto Combo est basé sur la capture immunologique de microparticules colorées lors de leur passage à travers une membrane sur laquelle a été immobilisé l'anticorps monoclonal.

Le test NADAL® Giardia-Crypto Combo utilise des anticorps monoclonaux spécifiques pour le *Cryptosporidium parvum* et *Giardia lamblia*, qui détectent toutes les formes du cycle vital des parasites.

Le test utilise des micro-sphères bleues associées de manière covalente à un anticorps monoclonal anti-*Cryptosporidium parvum*, des micro-sphères rouges associées de manière covalente à un anticorps monoclonal anti-*Giardia lamblia* et des micro-sphères vertes pour le contrôle du test.

Les parasites présents dans les échantillons de selles réagissent avec les particules de latex, qui sont recouvertes d'anticorps monoclonaux spécifiques à l'antigène. Ce complexe de particules de latex / anticorps / parasite migre par un processus chromatographique vers la zone de réaction. Dans cette zone, les anticorps anti-*Cryptosporidium* et anti- *Giardia lamblia* réagissent avec le complexe de particules de latex / anticorps / parasite. Cette réaction génère la formation d'une ligne bleue en présence *Cryptosporidium parvum* et d'une ligne rouge en présence de *Giardia lamblia*. Ces lignes sont utilisées pour l'interprétation du résultat, après cinq minutes d'incubation à température ambiante.

4. Composants du test

Le kit contient les éléments suivants:

- 10 test NADAL® Giardia-Crypto Combo
- 10 tubes collecteurs avec solution d'extraction
- 1 mode d'emploi

Matériel non fourni dans le kit:

- Chronomètre
- Pipettes graduées (en cas d'échantillon liquide)
- Embouts de pipettes (en cas d'échantillon liquide)

5. Conservation des réactifs

Le test NADAL® Giardia-Crypto Combo peut être conservé à toute température comprise entre 2 et 30°C (il peut être conservé au réfrigérateur) jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'emballage.

6. Avertissements et précautions

- Les échantillons des patients (selles) peuvent contenir des agents infectieux, et devront être traités et éliminés comme des matériaux biologiques potentiellement dangereux.
- Le tampon contient de l'azoture de sodium comme agent antimicrobien. Éviter le contact direct avec la peau et les muqueuses. Mettre au rebut de manière appropriée. Ne pas utiliser le tampon s'il présente des signes de contamination ou de précipitation.
- Ne pas manger, boire, fumer, stocker ou préparer des aliments dans la zone où sont manipulés les réactifs et les échantillons.
- Porter des gants jetables pour manipuler les échantillons. Se laver soigneusement les mains une fois le test terminé.
- Ne pas échanger les composants de kits présentant un numéro de lot différent.
- N'utiliser l'ensemble des réactifs qu'in vitro.
- Avant de les utiliser, laisser tous les composants du kit et les échantillons atteindre la température ambiante, car des réactifs et/ou des échantillons froids peuvent réduire l'efficacité du test. Il est recommandé d'attendre entre 20 et 30 minutes pour atteindre la température ambiante.
- Ne pas utiliser les composants du kit après les dates de péremption.
- En cas de rupture de l'emballage, le produit peut être utilisé si aucun des composants n'a été endommagé.
- Il est important d'ajouter la bonne quantité d'échantillon (4 à 5 gouttes de suspension). Si celle-ci est inférieure à celle indiquée, il est possible que la chromatographie ne se réalise pas parce que l'échantillon n'arrivera pas à la zone de réaction, et si elle est supérieure, des lignes marron pourront apparaître au lieu des lignes bleues ou rouges.
- Le produit usagé devra être éliminé conformément à la législation en vigueur.
- Ne pas utiliser le test si une ligne de couleur apparaît dans la zone des résultats avant de commencer à l'utiliser.
- Il est important de collecter la bonne quantité de selles : 30-50 mg de selles solides ou environ 100µl de selles liquides. Un excès d'échantillon empêche la réalisation d'une chromatographie correcte.

7. Recueil, préparation et conservation des échantillons

L'échantillon de selles doit être collecté dans un conteneur stérile approprié, dès que possible après le début des symptômes. Il faut tenter d'obtenir un échantillon représentatif. Les échantillons peuvent être conservés au réfrigérateur (à environ 4°C) pendant 1 à 2 jours avant d'être analysés. Pour une conservation plus longue, ils doivent être maintenus au congélateur à -20°C sans aucune manipulation préalable. Dans ce cas, l'échantillon sera décongelé totalement, jusqu'à température ambiante, et homogénéisé avant de procéder à l'analyse.

8. Exécution du test

Avant le test, ramener le test et les échantillons à températures ambiante (15-30°C). Effectuer le test immédiatement après l'ouverture de l'emballage, le test étant sensible à l'humidité.

1. Dévisser avec précaution le bouchon en évitant de renverser la solution d'extraction.



2. Collecter une quantité suffisante de selles (30-50 mg) à l'aide de l'écouvillon collecteur. Prendre des selles d'au moins trois parties différentes de l'échantillon pour obtenir un échantillon autant représentatif que possible. Si les selles sont liquides, collecter 100 µl d'échantillon avec une pipette.



3. Remettre l'écouvillon avec l'échantillon dans le tube collecteur. Refermer fermement le bouchon et mélanger vigoureusement pour homogénéiser.

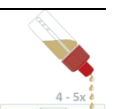


4. Sortir le test de son emballage en aluminium. Jeter le sachet de produit desséchant, étant donné que celui-ci ne sert qu'à préserver le test de l'humidité et qu'il n'est pas utilisé pour la réalisation du test.



Casser le haut du bouchon du tube collecteur.

5. Ajouter 4-5 gouttes de l'échantillon dans le puits de recueil de la cassette (signalé par une flèche). Éviter la présence de particules solide lors du dépôt de l'échantillon.



6. Interpréter le test après 5 minutes. Ne pas interpréter après 10 minutes.



9. Interprétation des résultats

L'interprétation du test se fait en fonction du nombre de lignes colorées apparues dans la fenêtre de lecture au niveau des zones de contrôle (C) et de test (T1 et T2).



Résultat positif:

Cryptosporidium:

Une ligne VERTE (C) et une ligne BLEUE (T1) apparaissent dans la zone de résultat. L'intensité de la ligne peut varier selon la concentration de l'antigène.



Giardia:

Une ligne VERTE (C) et une ligne ROUGE (T2) apparaissent dans la zone de résultat. L'intensité de la ligne peut varier selon la concentration de l'antigène.



Résultat négatif:

Seule la ligne de contrôle VERTE (C) apparaît dans la zone de résultat. Cette ligne doit toujours apparaître.



Résultat invalide:

Le test est invalide si aucune ligne de contrôle VERTE (C) n'apparaît dans la zone de résultat. Cela signifie que la procédure n'a pas été suivie correctement, que les réactifs sont détériorés ou que la quantité d'échantillon ajoutée n'est pas suffisante. Refaire le test avec une nouvelle cassette.



Note:

Ne pas interpréter le résultat du test après 10 minutes.

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

10. Contrôle qualité

Le test est invalide si aucune ligne de contrôle VERTE (C) n'apparaît dans la zone de résultat. Cela signifie que la procédure n'a pas été suivie correctement, que les réactifs sont détériorés ou que la quantité d'échantillon ajoutée n'est pas suffisante. Dans ce cas refaire le test avec une nouvelle cassette en suivant scrupuleusement la procédure d'exécution du test.

Attention : il est recommandé d'intégrer un contrôle du résultat connu pour garantir que les données obtenues soient correctes.

11. Limites du test

- Le diagnostic final ne devra pas être basé uniquement sur le résultat d'un test. Il devra être fondé sur la corrélation des résultats du test avec d'autres données appropriées et avec la symptomatologie clinique.
- Le test NADAL® Giardia-Crypto Combo ne doit être utilisé que pour la détection d'antigènes de *Cryptosporidium parvum* et *Giardia lamblia* dans les selles.
- Le test est qualitatif et aucune interprétation quantitative du résultat ayant une relation directe avec l'intensité de la ligne positive ne doit être effectuée.
- Un grand nombre d'échantillons ont été utilisés pour garantir le bon fonctionnement du test. La corrélation des résultats avec d'autres techniques (ELISA) s'est avérée excellente. Toutefois, des interférences dans le fonctionnement du test ne peuvent pas être écartées.
- En cas d'excès d'échantillon, il est possible d'observer soit l'apparition de lignes marron au lieu des lignes rouges et bleues, soit l'absence de ligne de test et de contrôle, en raison d'une chromatographie défectueuse. Les lignes marron n'ont aucune valeur en termes de diagnostic. Dans ce cas, refaire le test avec une quantité d'échantillon inférieure ou avec une dilution de l'extrait déjà obtenu.
- Aucune réaction croisée avec d'autres substances n'a été observée au cours de l'évaluation du test. Un résultat négatif n'exclut pas totalement une possible infection par *Cryptosporidium parvum* et *Giardia lamblia*. L'importance des résultats doit être évaluée parallèlement aux symptômes cliniques du patient.
- L'analyse de certains échantillons peut produire des lignes présentant des couleurs indéfinies, générées dans la majorité des cas par des échantillons négatifs. Si ces lignes de couleur indéfinie apparaissent, le test doit être répété. Si l'on obtient le même résultat, il est suggéré de réaliser l'analyse à l'aide d'une autre méthode analytique.

12. Performances du test

SENSIBILITÉ ET SPÉCIFICITÉ

Analyse 1 - Un test par technique ELISA portant le marquage CE a été utilisé comme technique de référence. Le test NADAL® Giardia-Crypto Combo a été évalué par rapport à ce test ELISA pour la détection d'antigènes de *Cryptosporidium*.

Les résultats ont été les suivants:

		Ridascreen Crypto ELISA		Total
		+	-	
Test NADAL®	+	19	0	19
Giardia-Crypto	-	8	53	61
Total		27	53	80

Pourcentage de concordance: 100% [(19+53)/80] = 90,0 %.

Concordance sensibilité estimée: 100% [19/(19+8)] = 70,4 % *

Concordance spécificité estimée: 100% [53/(0+53)] > 99,9 %

* Les 8 échantillons divergents ont été testés par PCR pour déterminer la présence d'ADN de *Cryptosporidium*. Ces tests ont donné un résultat négatif.

Analyse 2 - la détection du parasite par microscopie a été utilisée comme produit de référence. Le test NADAL® Giardia-Crypto Combo a été évalué par rapport à microscopie pour la détection d'antigènes de *Cryptosporidium*.

Les résultats ont été les suivants:

		Microscopie		Total
		+	-	
Test NADAL®	+	15	0	15
Giardia-Crypto	-	0	54	54
Total		15	54	69

Pourcentage de concordance: 100% [(15+54)/69] > 99,9 %.

Concordance sensibilité estimée: 100% [15/(15+0)] > 99,9 %

Concordance spécificité estimée: 100% [54/(0+54)] > 99,9 %

Analyse 3 - Un test par technique ELISA portant le marquage CE a été utilisé comme technique de référence. Le test NADAL® Giardia-Crypto Combo a été évalué par rapport à ce test ELISA pour la détection d'antigènes de *Giardia*.

Les résultats ont été les suivants:

		Ridascreen Giardia ELISA		Total
		+	-	
Test NADAL®	+	26	0	26
Giardia-Crypto	-	1	53	54
Total		27	53	80

Pourcentage de concordance: 100% [(26+53)/80] = 98,8 %.

Concordance sensibilité estimée: 100% [26/(26+1)] = 96,3 %

Concordance spécificité estimée: 100% [53/(0+53)] > 99,9 %

Analyse 4 - la détection du parasite par microscopie a été utilisée comme produit de référence. Le test NADAL® Giardia-Crypto Combo a été évalué par rapport à microscopie pour la détection d'antigènes de *Giardia*.

Les résultats ont été les suivants:

		Microscopie		Total
		+	-	
Test NADAL®	+	15	1	16
Giardia-Crypto	-	0	53	54
Total		15	54	69

Pourcentage de concordance: 100% [(15+53)/69] > 98,5 %.

Concordance sensibilité estimée: 100% [15/(15+0)] > 99,9 %

Concordance spécificité estimée: 100% [54/(1+53)] > 98,1 %

RÉPÉTIBILITÉ- PRÉCISION INTRA-TEST

Cinq reproductions de chaque concentration de la courbe de sensibilité ont été testées avec un lot. Les résultats obtenus sont identiques

REPRODUCTIBILITÉ

PRÉCISION INTER-JOUR

Quatre reproductions de la courbe de sensibilités ont été réalisées sur un lot de produit au cours de dix journées consécutives. Seule une différence inférieure à une dilution ½ a été observée, ce qui est acceptable et tolérable pour une technique immunochromatographique.

PRÉCISION INTER-LABORATOIRE

Trois techniciens de laboratoire différents ont testé ces mêmes échantillons en maintenant des niveaux de précision et de correspondance élevés. Seule une différence inférieure à une dilution ½ a été observée, ce qui est acceptable et tolérable pour une technique immunochromatographique.

PRÉCISION INTER-LOT

Une courbe de sensibilité a été réalisée en parallèle sur 3 lot de produit. L'analyse a été réalisée par une personne au cours de la même journée. Seule une différence inférieure à une dilution ½ a été observée, ce qui est acceptable et tolérable pour une technique immuno-chromatographique.

EFFET HOOK

Malgré l'absence d'un étalon de concentration connue, l'analyse de la courbe de sensibilité en partant de la plus forte concentration possible de l'étalon interne n'a pas révélé l'existence d'un effet Hook.

RÉACTIONS CROISÉES

Les substances présentées dans le tableau, à la concentration indiquée, n'ont donné lieu à aucune interférence dans le résultat. Un lot été utilisé pour la réalisation de l'étude.

Metronidazole	1,2 mg/ml
Racécadotril	0,72 mg/ml
Lopéramide	24 µg/ml
Atropine Braun	1,68 µg/ml
Cimétidine	1,92 mg/ml
Oméprazole	0,144 mg/ml
Néomycine	6,62 mg/ml
Ampicilline	7,2 mg/ml
Ibuprofène	5,76 mg/ml
Acide acétylsalicylique	4,8 mg/ml
Saccharose	8 mg/ml
Sang	10% (v/v)

MICROORGANISMES INTERFÉRENTS

Les microorganismes indiqués n'ont donné lieu à aucune interférence dans le résultat.

Bactérie/Parasites/Virus

Adenovirus
 Astrovirus
Blastocystis hominis
Campylobacter jejuni
Chilomastix mesnili
Endolimax nana
Entamoeba coli
Giardia lamblia
Helicobacter pylori
 huevos de *Taenia spp*
Iodamoeba bütschlii
 Rotavirus

13. Références

1. Clark D.P. "New insights into human Cryptosporidiosis". *Clinical Microbiology Reviews* (1999). Vol 12, n° 14, p. 554-563.
2. Garcia L.S. y Shimizu R.Y. "Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC combination rapid solidphase qualitative immunochromatographic assay". *Journal of Clinical Microbiology* (2000). Vol 38, n° 3, p. 1267-1268.
3. Sharp S.E. et al. "Evaluation of the Triage Micro Parasite Panel for detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* in patient stool specimens". *Journal of Clinical Microbiology* (2001). Vol 39, n° 1, p. 332-334.
4. Katanik M.T. et al. "Evaluation of ColorPac Giardia/Cryptosporidium rapid assay and ProSpecT Giardia/Cryptosporidium microplate assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in fecal specimens". *Journal of Clinical Microbiology* (2001). Vol 39, n° 12, p. 4523-4525.

Rev: 2012-07-02 AS

1. Uso previsto

El test cassette NADAL® Cripto-Giardia de nal von minden es un inmunoensayo cromatográfico para la detección cualitativa in vitro de antígenos de *Cryptosporidium* y *Giardia* en heces. El test está destinado únicamente para uso de diagnóstico in vitro profesional.

2. Significado clínico

Cryptosporidium es un parásito protozoario gastrointestinal que infecta a humanos y a animales causando una enfermedad conocida como *Cryptosporidiosis* intestinal, traqueal y pulmonar.

Giardia intestinalis, también llamada *Giardia lamblia*, es un parásito protozoario gastrointestinal de diversas especies (mamíferos, aves, etc.) causante de un cuadro clínico que varía de portador sin síntomas hasta enfermedad diarreica aguda o de larga duración, especialmente en los niños. Ambos parásitos se encuentran en todo el mundo, especialmente en zonas con malas condiciones sanitarias.

Al igual que *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* infecta a través de la ingestión de sus quistes, los cuales pueden permanecer viables incluso en agua clorada. Al llegar al duodeno, cada quiste libera hasta 4 trofozoitos flagelados (forma invasiva) que colonizan las células del duodeno y yeyuno proximal. El ciclo vital de *Cryptosporidium* es muy rápido y cada generación puede desarrollarse y madurar en 12-24 horas. Esto, junto con su carácter autoinfectioso, hace que el tracto intestinal sea infectado en pocos días por un gran número de parásitos. Diarrea, pérdida de peso y calambres abdominales son síntomas clínicos de la enfermedad que, en individuos inmunosuprimidos, 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.

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

3. Principio del test

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.

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

Los test están basados en el uso de tres microesferas: microesferas azules unidas covalentemente a un anticuerpo monoclonal anti-*Cryptosporidium parvum*, microesferas rojas unidas covalentemente a un anticuerpo monoclonal anti-*Giardia lamblia* y microesferas verdes 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* y anti-*Giardia* que reaccionan con el complejo partículas de látex/anticuerpos/parásito. Esta reacción origina la formación de una línea azul en el caso de Crypto y una línea roja en el caso de Giardia. Estas líneas se usan para interpretar el resultado a los diez minutos de incubación a temperatura ambiente.

4. Reactivos y materiales provistos

El kit tiene los siguientes componentes:

- 10 test cassettes NADAL® Giardia
- 10 viales con tampón de dilución
- 1 manual de instrucciones

Materiales requeridos (no incluidos en el kit):

- Cronómetro
- Pipetas graduables (para muestras de heces líquidas)
- Puntas de pipetas (para muestras de heces líquidas)

5. Almacenamiento y conservación

El test cassette NADAL® Giardia se puede conservar a cualquier temperatura comprendida entre 2 y 30°C (se puede almacenar en nevera). Su fecha de caducidad está impresa en el sobre.

6. Advertencias y precauciones

- Las muestras de los pacientes (heces) pueden contener agentes infecciosos y

deberán ser tratadas y desechadas como materiales biológicos potencialmente peligrosos.

- El tampón contiene ácido de sodio como agente antimicrobiano. Evite el contacto directo con la piel y las mucosas. Desechar de forma apropiada. No usar el tampón si manifiesta indicios de contaminación o precipitación.
- No comer, beber, fumar, almacenar o preparar alimentos en la zona donde se manejan los reactivos y las muestras.
- Llevar guantes desechables al manejar las muestras. Lavarse bien las manos al acabar de trabajar.
- No intercambiar los componentes de kits con distinto número de lote.
- Utilizar todos los reactivos únicamente *in vitro*.
- Antes de usarlos, dejar que todos los componentes del kit y muestras alcancen la temperatura ambiente, pues los reactivos y/o muestras fríos pueden reducir la funcionalidad del test. Se recomienda de 20 a 30 minutos para alcanzar la temperatura ambiente.
- No usar los componentes del kit después de la fecha de caducidad.
- En caso de ruptura del envase, el producto puede ser utilizado si ninguno de los componentes ha sido dañado.
- Es importante añadir la cantidad correcta de muestra (4-5 gotas de suspensión). Si es inferior a la indicada puede ser que no se realice la cromatografía porque no llegue muestra a la zona de reacción, si es superior pueden aparecer líneas marrones en vez de rojas y azules.
- 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 importante tomar la cantidad apropiada de la muestra: 30-50 mg de muestra sólida o 100 µl de muestra líquida. Una excesiva cantidad de muestra provoca una incorrecta cromatografía.

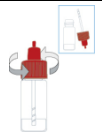
7. Preparación y recogida de la muestra

Se deben recoger las muestras fecales en un contenedor estéril apropiado, tan pronto como sea posible después del comienzo de los síntomas. Ha de intentarse que la muestra sea representativa. Las muestras pueden guardarse en el refrigerador (4°C aproximadamente) durante 1 o 2 días antes de ser analizadas. Para una conservación más prolongada, deben guardarse en el congelador a -20°C sin manipulación previa. En este caso, la muestra será descongelada totalmente, llevada a temperatura ambiente y homogeneizada antes de analizarla.

8. Procedimiento del test

Antes del test: permita que los test y la muestra alcancen temperatura ambiente (15 – 30°C). Una vez abierto el sobre de aluminio, los test deben realizarse rápidamente, ya que son sensibles a la humedad.

1. Desenroscar el tapón del vial con cuidado de no derramar el tampón de extracción.

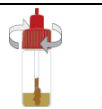


2. Con el extremo del aplicador **tomar** una cantidad suficiente de heces (**30 – 50 mg**). Tomar hez de al menos tres sitios diferentes de la muestra con el fin de obtener una muestra lo más representativa posible.

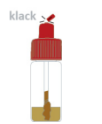


Si las heces son líquidas coger con ayuda de una pipeta 100 microlitros y transferirlos al vial.

3. Introducir el aplicador con la muestra en el vial. Enroscar bien el tapón y **agitar** vigorosamente para asegurar una mezcla homogénea.



4. Sacar el dispositivo de reacción de la bolsa de aluminio. Desechar la bolsita de desecante, puesto que solo sirve para preservar el test de la humedad y no se emplea en la realización del test.



Romper el extremo superior del vial.

5. Añadir **4 ó 5 gotas** en la zona para la muestra del dispositivo de reacción (ventana circular señalada con una flecha). No añadir partículas sólidas con el líquido.



6. Esperar 10 minutos, leer e interpretar los resultados. Cualquier línea que pueda aparecer tras 10 minutos no tendrá ningún significado.



9. Interpretación de resultados

Para interpretar los resultados, observe la línea que se haya formado en la ventana de resultados marcada con una C, T1 y T2.



Resultado positivo:

Cryptosporidium:

Aparecen una línea de color VERDE junto a letra C y una línea AZUL junto a letra T1 en la zona de resultados. La intensidad puede variar según la concentración de antígenos presente.



Giardia:

Aparecen una línea de color VERDE junto a letra C y una línea ROJA/ROSA junto a la letra T2 en la zona de resultados. La intensidad puede variar según la concentración de antígenos presente.



Resultado negativo:

Aparece solo una línea VERDE junto a la letra de control C. Esta línea debe de aparecer siempre.



Resultado inválido:

El test no es válido si no aparece la línea verde de control debido a que el procedimiento no se ha seguido correctamente, porque los reactivos se han deteriorado o por haber añadido una cantidad incorrecta de muestra. Repita el test con un nuevo dispositivo de reacción.



Nota:

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.

10. Control de calidad

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

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

11. Limitaciones

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

12. Características de rendimiento

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA

Ensayo 1 - Se toma como producto de referencia un producto de la técnica ELISA con marcado CE. El test NADAL® Crypto-Giardia fue evaluado frente a ELISAS para detección de antígenos de *Cryptosporidium*.

Los resultados fueron los siguientes:

		Ridascreen Crypto ELISA		Total
		+	--	
NADAL® Crypto	+	19	0	19
test cassette	--	8	53	61
Total		27	53	80

Porcentaje de concordancia: 100% [(19+53)/80] = 90,0%.

Concordancia sensibilidad estimada: 100% [19/(19+8)] = 70,4% *

Concordancia especificidad estimada: 100% [53/(0+53)] > 99,9%

* Las 8 muestras discrepantes fueron analizadas por PCR para determinar la presencia de ADN de *Cryptosporidium* obteniéndose un resultado negativo.

Ensayo 2 - Se toma como técnica de referencia la detección del parásito vía microscopio. El test NADAL® Crypto-Giardia fue evaluado frente a la detección de antígenos de *Cryptosporidium* con microscopio.

Los resultados fueron los siguientes:

		Microscopy		Total
		+	--	
NADAL® Crypto	+	15	0	15
test cassette	--	0	54	54
Total		15	54	69

Porcentaje de concordancia: 100% [(15+54)/69] > 99,9 %.

Concordancia sensibilidad estimada: 100% [15/(15+0)] > 99,9 %

Concordancia especificidad estimada: 100% [54/(0+54)] > 99,9 %

Ensayo 3 - Se toma un producto ELISA con marcado CE de referencia. El test NADAL® Crypto-Giardia fue evaluado frente a ELISAS para detectar antígenos de Giardia.

Los resultados fueron los siguientes:

		Ridascreen Giardia ELISA		Total
		+	--	
NADAL® Giardia	+	26	0	
test cassette	--	1	53	
Total		27	53	

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

Concordancia sensibilidad estimada: 100% [26/(26+1)] = 96,3 % *

Concordancia especificidad estimada: 100% [53/(0+53)] > 99,9 %

Assay 4 - Se toma la detección de parásitos vía microscopio como técnica de referencia. El test NADAL® Giardia-Crypto fue evaluado frente a la detección de antígenos de Giardia con el microscopio.

Los resultados fueron los siguientes:

		Microscopy		Total
		+	--	
NADAL® Giardia	+	15	1	16
test cassette	--	0	53	53
Total		15	54	69

Porcentaje de concordancia: 100% [(15+53)/69] > 98,5 %.

Concordancia sensibilidad estimada: 100% [15/(15+0)] > 99,9 %

Concordancia especificidad estimada: 100% [53/(1+53)] > 98,1 %

REPETITIVIDAD- PRECISION INTRAENSAYO

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

REPRODUCIBILIDAD

PRECISION INTERDÍA

Con 1 lote de producto, se realizan cuatro réplicas de la curva de sensibilidad a lo largo de diez días consecutivos. Sólo se aprecia una diferencia menor a una dilución ½, asumible y tolerable la técnica inmunocromatográfica.

PRECISION INTERLABORATORIO

Tres laboratorios-operadores distintos ensayan esas mismas muestras manteniendo precisiones y concordancias elevadas. Sólo se aprecia una diferencia de una dilución ½, asumible y tolerable por la técnica inmunocromatográfica.

PRECISION INTERLOTE

Con 3 lotes de producto se realiza una curva de sensibilidad por duplicado. El análisis lo realiza una persona y en el mismo día. Sólo se aprecia una diferencia menor a una dilución ½, asumible y tolerable por la técnica inmunocromatográfica.

EFECTO HOOK

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

SUSTANCIAS INTERFERENTES

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

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)

MICROORGANISMOS INTERFERENTES

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

Bacteria/Parásitos/Virus

Adenovirus
Astrovirus
Blastocystis hominis
Campylobacter jejuni
Chilomastix mesnili
Endolimax nana
Entamoeba coli
Giardia lamblia
Helicobacter pylori
Huevos de *Taenia spp*
Iodamoeba bütschlii
Rotavirus

13. Referencias

1. Clark D.P. "New insights into human Cryptosporidiosis". *Clinical Microbiology Reviews* (1999). Vol 12, nº 14, p. 554-563.
2. Garcia L.S. y Shimizu R.Y. "Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC combination rapid solidphase qualitative immunochromatographic assay". *Journal of Clinical Microbiology* (2000). Vol 38, nº 3, p. 1267-1268.
3. Sharp S.E. et al. "Evaluation of the Triage Micro Parasite Panel for detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* in patient stool specimens". *Journal of Clinical Microbiology* (2001). Vol 39, nº 1, p. 332-334.
4. Katanik M.T. et al. "Evaluation of ColorPac Giardia/Cryptosporidium rapid assay and ProSpecT Giardia/Cryptosporidium microplate assay for detection of Giardia and Cryptosporidium in fecal specimens". *Journal of Clinical Microbiology* (2001). Vol 39, nº 12, p. 4523-4525.

Rev: 2012-06-27 IA

1. Uso Previsto

Il test NADAL® Giardia-Crypto Combo a cassetta di nal von minden è un immunosaggio cromatografico per la determinazione di antigeni di *Giardia* e *Cryptosporidium* in campioni di feci. Il test è stato ideato solo per uso professionale di diagnostica in vitro.

2. Introduzione

Il *Cryptosporidium* è un parassita protozoico gastrointestinale che infetta esseri umani ed animali, che causano una malattia nota come cryptosporidiosi intestinale, della trachea e polmonare.

La *Giardia intestinalis*, chiamata anche *Giardia lamblia*, è un parassita protozoico gastrointestinale che causa una situazione clinica che varia da portatori senza sintomi a casi di diarrea acuta o cronica, specialmente nei bambini. Entrambi i parassiti sono diffusi in tutto il mondo, specialmente nelle aree con condizioni sanitarie precarie.

Come il *Cryptosporidium*, la *Giardia lamblia* infetta attraverso l'ingestione delle sue cisti, che possono rimanere viventi anche in acqua clorurata. Quando le cisti reagiscono con il duodeno, entrambi rilasciano fino a 4 trofozoiti flagellati (di forma invasiva) che colonizzano le cellule nel duodeno e nell'intestino digiuno vicino. Il ciclo di vita del *Cryptosporidium* è molto breve, ogni generazione può svilupparsi e maturare in 12-24 ore. Questo, insieme al suo carattere auto-infettivo, conduce ad infezioni del tratto intestinale da parte di un gran numero di parassiti in pochi giorni. Diarrea, perdita di peso e crampi addominali sono i sintomi clinici della malattia, che può produrre uno sbilanciamento elettrolitico in individui immunodepressi. La cryptosporidiosi polmonare e tracheale è associata a tosse e febbre, spesso accompagnate da alterazioni intestinali. Questi sintomi si sviluppano generalmente 4-6 giorni dopo l'infezione, anche se possono potenzialmente apparire in un qualsiasi momento tra 2-10 giorni dopo l'infezione.

Nel caso di *Giardia lamblia*, i sintomi appaiono 1-3 settimane dopo il contagio, in seguito ad un periodo di incubazione di circa 8 giorni. La manifestazione più frequente è caratterizzata da diarrea, perdita di peso, dolori addominali tipo coliche ed arresto di crescita e sviluppo. L'apparire dei sintomi può essere improvviso o graduale; la malattia può autolimitarsi o produrre diarrea intensa in caso di limitato assorbimento intestinale. Nei bambini sono comuni alterazioni della funzione digestiva. Ci sono sintomi persistenti, come un limitato assorbimento di zucchero (in particolare disaccaridi, come saccarosio e lattosio), grassi e vitamine liposolubili. L'intolleranza al lattosio segue comunemente infezioni acute e ricadute o ri-infezioni possono apparire. In casi rari i trofozoiti invadono la parete intestinale, causando diarrea infiammatoria e febbre. Non è stato documentato se producano sostanze tossiche.

3. Principio del Test

Il test a cassetta NADAL® Giardia-Crypto Combo è basato sulla cattura immunologica di micro particelle colorate nel momento in cui passano attraverso una membrana sulla quale sono stati fissati anticorpi monoclonali.

Il test a cassetta NADAL® Giardia-Crypto Combo utilizza anticorpi monoclonali specifici di *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia* che individuano ogni forma del ciclo di vita del parassita.

I test sono basati sull'uso di tre microsferi: microsferi blu che sono legate covalentemente ad anticorpi monoclonali anti-*Cryptosporidium parvum*, microsferi rosse che sono collegate covalentemente ad anticorpi monoclonali anti-*Giardia lamblia* e microsferi verdi che sono utilizzate come controllo del test. I parassiti presenti nel campione di feci reagiscono con le particelle di lattice che sono fissate con gli anticorpi monoclonali specifici contro l'antigene. Questo complesso particelle/anticorpi/parassita migra attraverso un processo cromatografico verso l'area di reazione. In quest'area ci sono anticorpi anti-*Cryptosporidium* ed anticorpi anti-*Giardia*, che reagiscono con il complesso particelle/anticorpi/parassita. Questa reazione porta all'apparire di una linea blu del caso di Crypto e rossa in caso di Giardia. Queste linee sono utilizzate per interpretare il risultato dopo un'incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente.

4. Reagenti e Materiali Forniti

Questo kit ha i seguenti componenti:

- 10 test a cassetta NADAL® Giardia-Crypto Combo
- 10 tubi di plastic contenenti soluzione tampone
- 1 foglio illustrativo

Materiali richiesti (non inclusi nel kit):

- Cronometro o timer
- Pipette che possono essere graduate (per campioni di feci liquide)
- Punte per le pipette (per campioni di feci liquide)

5. Conservazione e stabilità

Il test kit NADAL® Giardia-Crypto Combo può essere conservato a temperature tra 2°C e 30°C (può essere conservato in frigo). La data di scadenza è stampata nella busta sigillata e sull'etichetta sterna della confezione.

6. Avvertenze e precauzioni

- I campioni dei pazienti (feci) possono contenere agenti infettivi e devono essere trattati e smaltiti come materiale potenzialmente e biologicamente pericoloso.
- Il tampone contiene azoturo di sodio come agente antimicrobico. Evitare il contatto diretto con la pelle e le mucose. Smaltire in modo

appropriato. Non utilizzare il tampone se ci sono segni di contaminazione o precipitazione.

- Non conservare o preparare cibo, mangiare, bere o fumare nell'area dove i reagenti ed il tampone vengono maneggiati
- Indossare guanti protettivi durante il maneggiamento dei campioni. Lavare attentamente le mani dopo aver finito di lavorare.
- Non mischiare componenti di kit con differenti numeri di lotto.
- Tutti i reagenti devono essere utilizzati solo in vitro
- Prima dell'uso, lasciare che tutti i componenti ed i campioni raggiungano la temperatura ambiente, perché i reagenti e/o i campioni freddi riducono l'efficienza del test. Circa 20-30 minuti sono sufficienti perché il test raggiunga la temperatura ambiente.
- Non usare i componenti del kit dopo la data di scadenza
- Se la confezione è rotta, il prodotto può comunque essere utilizzato, se nessuno dei componenti è stato danneggiato.
- È importante aggiungere la corretta quantità di campione (4-5 gocce di sospensione). Se ne viene utilizzato meno di quanto indicato, la cromatografia potrebbe non verificarsi, in quanto il campione potrebbe non raggiungere l'area di reazione; se ne viene utilizzato troppo potrebbero apparire linee marroni al posto di quelle rosse o blu.
- Il prodotto usato dev'essere smaltito in conformità con la normativa vigente
- Non utilizzare il test se appaiono linee colorate nella finestra di reazione prima di iniziare ad utilizzare il test.
- È importante prelevare un campione di feci appropriato: 30-50 mg di feci solide o circa 100 µL di feci liquide. Un campione eccessivo previene una cromatografia corretta.

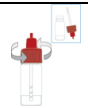
7. Raccolta e preparazione del campione

I campioni di feci dovrebbero essere raccolti in contenitori sterili appropriati il prima possibile dopo che i sintomi si manifestano. Il campione dovrebbe essere rappresentativo, se possibile. I campioni possono essere conservati in frigo (approssimativamente a 4°C) per 1-2 giorni prima di essere analizzati. Per conservare i campioni per periodi più lunghi, conservarli in un congelatore a -20°C, con nessun altro tipo di manutenzione. In questo caso il campione dev'essere completamente scongelato, portato a temperatura ambiente e omogeneizzato prima dell'analisi.

8. Procedura del Test

Prima del test: si raccomanda di lasciare che i test e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (15-30°C). Dopo l'apertura della busta sigillata il test dovrebbe essere svolto velocemente, in quanto sensibile all'umidità.

1. Svitare attentamente il tappo del flacone, in modo da non rovesciare il tampone di estrazione.



2. Raccogliere un volume sufficiente di sostanza fecale (30-50 mg) con la punta dell'applicatore. Prendere campioni da almeno tre differenti siti del campione, in modo da ottenere un campione il più rappresentativo possibile.



Se le feci sono liquide, raccogliere 100µl con l'aiuto di una pipetta e trasferirli nella fiala.

3. Introdurre l'applicatore con il campione nella fiala. Avvitare strettamente il tappo ed agitare vigorosamente, per assicurare una miscela omogenea.



4. Prelevare il dispositivo di distribuzione dalla busta di alluminio. Smaltire la bustina di essiccante; non viene usata durante il test, il suo unico scopo è proteggere il test dall'umidità. Rompere l'estremità superiore della fiala.



5. Aggiungere 4 o 5 gocce all'area per il campione del dispositivo di reazione (finestre circolari marcate con una freccia). Non aggiungere particelle solide insieme al liquido.



6. Aspettare esattamente 10 minuti poi leggere ed interpretare i risultati.

Qualsiasi linea che appaia dopo 10 minuti non ha valore diagnostico.



9. Interpretazione dei Risultati

Per interpretare i risultati guardare le linee che si sono formate nella finestra di reazione, segnata con C, T1 e T2.



Risultato positivo:

Cryptosporidium:

Una linea di controllo **VERDE** ed una separate linea test **BLU** T1 appaiono nella finestra di lettura. L' intensità può variare a seconda della concentrazione di antigene presente.



Giardia:

Una linea di controllo **VERDE** ed una separate linea test **ROSSA/ROSA** T2 appaiono nella finestra di lettura. L' intensità può variare a seconda della concentrazione di antigene presente.



Risultato negativo:

C'è solo una singola linea di controllo **VERDE** nella finestra di lettura. Questa linea deve sempre apparire.



Risultato non valido:

Il test è **INVALIDO** se non appare nessuna linea verde, perchè la procedura non è stata seguita correttamente, i reagent si sono deteriorate o perchè è stato aggiunto un volume scorretto di campione. Ripetere il test con un nuovo test a cassetta.



Nota:

Qualsiasi line ache appaia dopo 10 minuti non ha nessun valore diagnostic, in ragione della natura del campione.

Una diagnosi finale non dovrebbe essere basata solo sui risultati di un test. La diagnosi dovrebbe essere stabilita sulla base della correlazione tra i risultati del test, altri dati appropriati e sintomi clinici

10. Controllo di qualità

Il test non è valido se non appare nessuna linea verde, sia in caso il test non sia stato svolto correttamente o i reagent fossero deteriorate. Se questo succede, ripetere le analisi, seguendo attentamente il protocollo di lavoro descritto nel foglio illustrativo.

AVVERTENZA: Includere un controllo con un risultato prestabilito è raccomandato per assicurare che i dati ottenuti siano corretti.

11. Limiti del Test

- Una diagnosi finale non dovrebbe essere basata solo sui risultati di un test. La diagnosi dovrebbe essere stabilita sulla base della correlazione tra i risultati del test, altri dati appropriati e sintomi clinici.
- Il test NADAL® Giardia-Crypto Combo dovrebbe essere utilizzato solo per la determinazione di antigeni di *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia* in campioni di feci.
- Questo è un test qualitativo, nessuna interpretazione quantitative dei risultati dovrebbe essere effettuata in riferimento all'intensità delle linee di positività.
- Un grande numero di campioni sono stati valutati per assicurare un corretto funzionamento del test. La correlazione dei risultati con altre tecniche (ELISA) si è dimostrata eccellente. In ogni caso non si possono escludere interferenze nella performance del test.
- Se si utilizza troppo campione possono apparire linee marroni, invece di quelle rosse e blu, oppure potrebbero non esserci linee test e linea di controllo perché la cromatografia non funziona correttamente. Le linee marroni non hanno valore diagnostico. Se questo succede ripetere il test con una minore quantità di feci o diluire l'estratto precedentemente preparato.
- Non si è osservata nessuna reazione incrociata con altre sostanze durante la valutazione del test. Un risultato negative non esclude completamente la possibilità di infezioni di *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia*. L' importanza dei risultati dovrebbe essere valutata in relazione ai sintomi clinici del paziente.
- L'analisi di alcuni campioni può produrre linee di colore indefinito, causate, nella maggior parte dei casi, da campioni negativi. Il test dovrebbe essere ripetuto se appaiono linee di colore indeterminato. Se si ottiene nuovamente lo stesso risultato, l'analisi dev'essere effettuata con un altro metodo analitico.

12. Caratteristiche della performance

SENSITIVITÀ E SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA

Saggio 1 – Un prodotto ELISA marchiato CE è stato preso come prodotto di riferimento. Il test NADAL® Giardia-Crypto Combo è stato valutato in confront all' ELISA per individuare antigeni di *Cryptosporidium*.

I risultati sono stati i seguenti:

	Ridascreen Crypto ELISA		Totale
	+	--	
NADAL® Crypto +	19	0	19
Test a cassetta --	8	53	61
Totale	27	53	80

Percentuale di concordanza: = 90,0% 100% [(19+53)/80]

Stima della concordanza della sensitività: = 70,4% * 100% [19/(19+8)]

Stima della concordanza della specificità: > 99,9% 100% [53/(0+53)]

*Gli otto campioni divergenti sono stati analizzati da PCR per determinare la presenza di *Cryptosporidium* nel DNA, con un risultato negativo.

Saggio 2 – La determinazione di parassiti al microscopio è stata presa come tecnica di riferimento. Il test NADAL® Giardia-Crypto Combo è stato valutato in confronto alla determinazione di antigeni del *Cryptosporidium* al microscopio. I risultati sono stati i seguenti:

	Microscopio		Totale
	+	--	
NADAL® Crypto +	15	0	15
Test a cassetta --	0	54	54
Totale	15	54	69

Percentuale di concordanza: > 99,9% 100% [(15+54)/69]

Stima della concordanza della sensitività: > 99,9% 100% [15/(15+0)]

Stima della concordanza della specificità: > 99,9% 100% [54/(0+54)]

Saggio 3 – Un prodotto ELISA marchiato CE è stato preso come prodotto di riferimento. Il test NADAL® Giardia-Crypto Combo è stato valutato in confronto all' ELISA per la determinazione di antigeni di *Giardia*. I risultati sono stati i seguenti:

	Ridascreen Giardia ELISA		Totale
	+	--	
NADAL® Giardia +	26	0	26
Test a cassetta --	1	53	54
Totale	27	53	80

Percentuale di concordanza: = 98,8% 100% [(26+53)/80]

Stima della concordanza della sensitività: = 96,3% * 100% [26/(26+1)]

Stima della concordanza della specificità: > 99,9% 100% [53/(0+53)]

Saggio 4 - La determinazione di parassiti al microscopio è stata presa come tecnica di riferimento. Il test NADAL® Giardia-Crypto Combo è stato valutato in confronto alla determinazione di antigeni di *Giardia* al microscopio. I risultati sono stati i seguenti:

	Microscopio		Totale
	+	--	
NADAL® Giardia +	15	1	16
Test a cassetta --	0	53	53
Totale	15	54	69

Percentuale di concordanza: > 98,5% 100% [(15+53)/69]

Stima della concordanza della sensitività: > 99,9% 100% [15/(15+0)]

Stima della concordanza della specificità: > 98,1% 100% [53/(1+53)]

RIPETIBILITÀ PRECISIONE INTRA-SAGGIO

Cinque repliche di ogni concentrazione della curva di sensibilità sono state testate con un lotto, ottenendo lo stesso risultato.

RIPRODUCIBILITÀ

PRECISIONE INTRA-GIORNI

Utilizzando un lotto di prodotto, sono state effettuate 4 repliche della curva di sensibilità in 10 giorni. È stata individuata solo una differenza minore di 1:2 diluizione, che è accettabile e tollerabile per la tecnica immunocromatografica.

PRECISIONE INTRA-LABORATORI

Tre tecnici di laboratorio differenti hanno testato gli stessi campioni, mantenendo un' elevate precision e concordanza. È stata individuata solo una differenza di 1:2 diluizione, che è accettabile e tollerabile per la tecnica immunocromatografica.

PRECISIONE INTRA-LOTTO

È stata effettuata una curva di sensibilità in duplicato con 3 lotti di prodotto. Le analisi sono state svolte dalla stessa persona nello stesso giorno. È stata individuata solo una differenza di 1:2 diluizione, che è accettabile e tollerabile per la tecnica immunocromatografica.

EFFETTO HOOK

Non è stata disponibile nessuna concentrazione standard nota. Comunque l'analisi della sensibilità della curva basata sul massimo della concentrazione possibile di uno standard interno non ha mostrato l'esistenza di nessun effetto hook.

SOSTANZE INTERFERENTI

Le sostanze indicate nella tabella, alla concentrazione espresso, non hanno interferito con i risultati. È stato utilizzato un lotto per la ricerca

Metronidazolo	1,2 mg/ml
Racecadotril	0,72 mg/ml
Loperamide	24 µg/ml
Braun Atropina	1,68 µg/ml
Cimetidina	1,92 mg/ml
Omeprazolo	0,144 mg/ml
Neomicina	6,62 mg/ml
Ampicillina	7,2 mg/ml
Ibuprofeno	5,76 mg/ml
Acido acetilsalicylico	4,8 mg/ml
Saccarosio	8 mg/ml
Sangue	10% (v/v)
Metronidazolo	1,2 mg/ml

MICROORGANISMI INTERFERENTI

I microorganismi qui sotto indicati non hanno mostrato interferenze

Batteri/Parassiti/Virus

Adenovirus
Astrovirus
Blastocystis hominis
Campylobacter jejuni
Chilomastix mesnili
Endolimax nana
Entamoeba coli
Giardia lamblia
Helicobacter pylori
huevos de *Taenia spp*
Iodamoeba bütschlii
Rotavirus

13. Bibliografia

1. Clark D.P. "New insights into human Cryptosporidiosis". *Clinical Microbiology Reviews* (1999). Vol 12, n° 14, p. 554-563.
2. Garcia L.S. y Shimizu R.Y. "Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC combination rapid solidphase qualitative immunochromatographic assay". *Journal of Clinical Microbiology* (2000). Vol 38, n° 3, p. 1267-1268.
3. Sharp S.E. et al. "Evaluation of the Triage Micro Parasite Panel for detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* in patient stool specimens". *Journal of Clinical Microbiology* (2001). Vol 39, n° 1, p. 332-334.
4. Katanik M.T. et al. "Evaluation of ColorPac Giardia/Cryptosporidium rapid assay and ProSpecT Giardia/Cryptosporidium microplate assay for detection of Giardia and Cryptosporidium in fecal specimens". *Journal of Clinical Microbiology* (2001). Vol 39, n° 12, p. 4523-4525.

Rev: 2012-07-02 CG

1. Zastosowanie

Test kasetowy NADAL[®] Giardia-Crypto Combo firmy nal von minden jest jakościowym szybkim testem immunochromatograficznym do wykrywania antygenów *Giardii* i *Cryptosporidium* w próbkach kału. Test jest przeznaczony tylko do profesjonalnej diagnostyki in-vitro.

2. Wprowadzenie i / lub znaczenie diagnostyczne

Cryptosporidium jest pierwotniakiem przewodu pokarmowego, który zakaża ludzi i zwierzęta powodując chorobę znaną jako kryptosporidioza jelitowa, oskrzeli i płucna.

Giardia intestinalis, zwana także *Giardia lamblia* jest pierwotniakiem przewodu pokarmowego wywołującym obraz kliniczny, który obejmuje przypadki od bezobjawowych nosicieli do przypadków ostrej lub chronicznej biegunki, zwłaszcza u dzieci. Oba pasożyty są spotykane na całym świecie, szczególnie na obszarach o ograniczonych warunkach sanitarnych.

Tak jak *Cryptosporidium*, tak i *Giardia lamblia* zakaża przez spożycie ich cyst, które pozostają zdolne do życia nawet w chlorowanej wodzie. Kiedy cysty dotrą do dwunastnicy, każda uwalnia do 4 uzbrojonych trofozoitów (forma inwazyjna), które kolonizują komórki w dwunastnicy i jelicie czczym. Cykl życiowy *Cryptosporidium* jest bardzo krótki; każda generacja może się rozwinąć i osiągnąć formę dojrzałą w ciągu 12-24 godzin. To, w połączeniu z ich samo-infekującym charakterem prowadzi do zainfekowania układu pokarmowego przez dużą liczbę pasożytów w ciągu zaledwie kilku dni. Biegunka, utrata wagi i skurcze brzucha są klinicznymi symptomami tej choroby, która wywołuje nierównowagę elektrolitową u osób, u których występuje immunosupresja. Kryptosporidioza oskrzeli i płuc jest powiązana z kaszlem i gorączką, a ponadto często towarzyszą jej zmiany jelitowe. Objawy te zazwyczaj rozwijają się w ciągu 4-6 dni po infekcji, jednakże mogą pojawić się w każdym momencie w przebiegu 2-10 dni.

W przypadku *Giardii lamblia*, symptomy pojawiają się w ciągu 1-3 tygodni po infekcji, po około 8 dniowym okresie inkubacji. Najczęściej występującymi objawami są biegunka, utrata wagi, bóle brzucha podobne do kolki, zahamowany wzrost i rozwój. Początkowo, symptomy mogą być nagłe bądź stopniowe; choroba może być samoograniczająca lub wywoływać ostrą biegunkę wskutek osłabionej zdolności wchłaniania jelitowego. Zmiany funkcji trawiennych występują najczęściej u dzieci. Występują trwałe objawy, takie jak słabe wchłanianie cukru (szczególnie dwucukrów takich jak sacharoza i laktoza), tłuszczy i witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Najczęściej spotykaną ostrą infekcją jest nietolerancja laktozy z dużym ryzykiem nawrotu lub ponownego zakażenia się. W niewielu przypadkach, trofozoity atakują ściany jelita powodując biegunkę zapalną i gorączkę. To, czy *Giardia* produkuje substancje toksyczne, nie zostało udokumentowane.

3. Zasada działania testu

Test kasetowy NADAL[®] Giardia-Crypto Combo opiera się na immunologicznym wychwytywaniu mikrocząsteczek przepływających przez membranę, na której są unieruchomione monoklonalne przeciwciała.

Test kasetowy NADAL[®] Giardia-Crypto Combo wykorzystuje monoklonalne specyficzne przeciwciała *Cryptosporidium parvum*- i *Giardia lamblia*, które wykrywają wszystkie formy cyklu życia pasożytów.

Test opiera się na zastosowaniu trzech mikrosfer: niebieskie mikrosfery, które są kowalencyjnie związane z monoklonalnym przeciwciałem przeciw *Cryptosporidium parvum*, czerwone mikrosfery, które są kowalencyjnie związane z monoklonalnym przeciwciałem *Giardia lamblia* i zielone mikrosfery, które są używane jako kontrola testu.

Obecny w próbce kału pasożyt reaguje z cząsteczkami lateksu pokrytymi przeciwciałami monoklonalnymi, specyficznymi przeciwko antygenowi. Ten kompleks złożony z cząsteczek, przeciwciał i pasożytów migruje w wyniku procesu chromatograficznego w kierunku obszaru reakcji. W obszarze tym są przeciwciała anty-*Cryptosporidium* i *Giardia*, które reagują z kompleksem cząsteczki/przeciwciała/pasożyty. Reakcja ta prowadzi do pojawienia się niebieskiej linii w przypadku Crypto i czerwonej linii w przypadku Giardia. Linie umożliwiają interpretację wyników w ciągu 10 minut przy inkubacji w temperaturze pokojowej.

4. Części składowe zestawu

Zestaw zawiera następujące elementy:

- 10 testów kasetowych NADAL[®] Giardia-Crypto Combo
- 10 plastikowych pojemników z buforem
- 1 instrukcja obsługi

Materiały wymagane (nie dostarczone w zestawie):

- Stoper lub zegarek
- Pipety plastikowe (do płynnych próbek kału)
- Końcówki do pipet (do płynnych próbek kału)

5. Data ważności i przechowywanie

Zestaw testów kasetowych NADAL[®] Giardia-Crypto Combo może być przechowywany w temperaturze 2°C - 30°C (może być przechowywany w lodówce). Data ważności została wydrukowana na torebce foliowej oraz na etykiecie opakowania.

6. Uwagi i środki ostrożności

- Próbkę kału pobrane od pacjentów mogą zawierać środki zakaźne i powinny być traktowane i usuwane jako potencjalnie niebezpieczny materiał

biologiczny.

- Bufor zawiera azydek sodu jako środek przeciwbakteryjny. Należy unikać bezpośredniego kontaktu ze skórą i śluzówkami. Zużyty bufor właściwie usunąć. Nie używać buforu, jeśli istnieją przesłanki wskazujące na jego zanieczyszczenie lub wytrącenie.
- Nie przechowywać żywności i nie przygotowywać posiłków, nie jeść, nie pić, nie palić w miejscu, w którym znajdują się odczynniki i przygotowywane są próbki.
- W czasie pobierania próbki zakładać rękawiczki. Umyć ręce po zakończeniu pracy.
- Nie zamieniać elementów z zestawów o różnych numerach serii.
- Korzystać ze wszystkich odczynników tylko *in vitro*.
- Przed użyciem, wszystkie elementy zestawu i próbki należy doprowadzić do temperatury pokojowej, ponieważ zimno testu lub próbki może zmniejszyć funkcjonalność testu. Około 20-30 minut to czas wystarczający do osiągnięcia właściwej temperatury.
- Nie używać zestawu po upłynięciu daty ważności.
- Jeżeli opakowanie zostało uszkodzone, test może zostać nadal użyty, o ile żaden z elementów nie został uszkodzony.
- Ważne jest, aby na kasetkę umieścić odpowiednią ilość próbki (4-5 kropli). Jeśli do testu zostanie użyta mniejsza ilość niż wskazana, chromatografia może nie wystąpić, gdyż próbka może nie dotrzeć do obszaru reakcji. Jeśli dodana ilość będzie większa niż zalecana, zamiast czerwonych i niebieskich linii na teście mogą pojawić się linie brązowe.
- Zużyty produkt należy usunąć zgodnie z obowiązującymi przepisami.
- Nie używać testu, jeśli kolorowe linie pojawiły się w polu wyników, przed jego rozpoczęciem.
- Ważne jest, aby pobrać odpowiednią ilość próbki kału: 30-50 mg w przypadku stolca stałego, lub ok. 100 ul w przypadku stolca płynnego. Nadmierna ilość próbki uniemożliwiła prawidłową chromatografię.

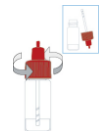
7. Pobieranie, rozcieńczanie i przechowywanie próbki

Próbki kału należy pobierać z użyciem odpowiedniego, sterylnego pojemnika, najszybciej jak to możliwe po wystąpieniu objawów. Próbki mogą być przechowywane w lodówce (w temperaturze ok. 4 °C) przez 1-2 dni przed wykonaniem analizy. Aby zachować próbki na dłuższy czas, należy je przechowywać w zamrażarce w temperaturze -20°C, bez dalszego przetwarzania próbki. W takim przypadku, próbka musi zostać rozmrożona, następnie zostać doprowadzona do temperatury pokojowej i zhomogenizowana przed analizą.

8. Przeprowadzenie testu

Przed rozpoczęciem testowania, proszę doprowadzić testy i próbki do temperatury pokojowej (15 – 30°C). Po otwarciu folii ochronnej, badanie powinno zostać przeprowadzone możliwie szybko, ponieważ testy są wrażliwe na wilgoć.

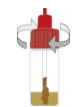
1. Ostrożnie odkręcić korek fiołki, aby nie rozlać buforu ekstrakcyjnego.



2. Pobrać odpowiednią ilość próbki (30-50 mg) za pomocą końcówki aplikatora. Należy pobrać próbkę przynajmniej z trzech różnych części kału tak, aby próbka była możliwie najbardziej reprezentatywna. Jeżeli stolec jest płynny, należy pobrać 100 µl za pomocą pipety oraz umieścić we fiolce.



3. Wprowadzić aplikator z próbką kału do fiołki. Przykręcić mocno zakrętkę, następnie energicznie wstrząsnąć, aby zapewnić jednolitą mieszaninę.



4. Wyciągnąć urządzenie do reakcji z torebki aluminiowej. Wyrzucić torebkę zawierającą środek suszący, która nie jest używana do badania, a jej celem jest wyłącznie ochrona przed wilgocią.



Złamać górną końcówkę fiołki.

5. Dodać 4 - 5 kropli na obszar reakcyjny testu (okrągłe okienko na kasce testu). Nie dodawać cząstek stałych wraz z cieczą.



9. Interpretacja wyników

Aby zinterpretować wynik testu, proszę spojrzeć na przedstawiony wzór linii, które pojawiają się w okienku odczytu, oznaczonego C, T1 i T2.



Wynik pozytywny:

Cryptosporidium:

ZIELONA linia kontrolna C i osobna **NIEBIESKA** linia testowa T1 pojawiają się w oknie wyników. Intensywność kolorów może być różna w zależności od obecnej koncentracji antygenu.



Giardia:

ZIELONA linia kontrolna C i osobna **CZERWONA/RÓŻOWA** linia testowa T2 pojawia się w oknie wyników. Intensywność kolorów może być różna w zależności od obecnej koncentracji antygenu.



Wynik negatywny:

Pojawia się tylko pojedyncza **ZIELONA** linia kontrolna C w oknie wyników. Ta linia powinna się zawsze pojawić.



Wynik nieważny:

Test jest **NIEWAŻNY**, jeżeli nie pojawiła się linia zielona, z powodu niewłaściwie przeprowadzonej procedury testu, użyte odczynniki były niewłaściciel jakości, bądź gdy została dodana niewłaściwa ilość próbki. Test należy przeprowadzić ponownie za pomocą nowej kasetki.



Ważne:

Każda linia, która pojawiła się w okienku wyników po upływie 10 minut z powodu jakości próbki nie posiada żadnej wartości diagnostycznej.

Ostateczna diagnoza nie powinna być oparta o wyniki jednego testu. Diagnoza powinna zostać stwierdzona w wyniku porównania wyników testu z innymi odpowiednimi danymi oraz objawami klinicznymi

10. Kontrola jakości

Test jest nieważny, jeśli nie pojawi się zielona linia, co oznacza, że został przeprowadzony nieprawidłowo lub użyte odczynniki uległy pogorszeniu. W takiej sytuacji, należy powtórzyć badanie, zgodnie z procedurą opisaną w niniejszej instrukcji.

OSTRZEŻENIE: Zalecane jest potwierdzenie uzyskanego wyniku w celu kontroli jego prawidłowości.

12. Ograniczenia testu

- Ostateczna diagnoza nie powinna być stwierdzona jedynie w oparciu o wynik jednego testu. Diagnoza powinna zostać stwierdzona w wyniku porównania wyników testu z innymi odpowiednimi danymi oraz objawami klinicznymi.
- Test NADAL® Giardia-Crypto Combo powinien być użyty jedynie do wykrywania antygenów *Cryptosporidium parvum* i *Giardia lamblia* w próbce kału.
- Niniejszy test jest testem jakościowym, a intensywność linii nie świadczy o ilościowej interpretacji testów.
- Poddana ocenie została bardzo duża liczba próbek, aby zapewnić prawidłowe funkcjonowanie testu. Korelacja wyników z innymi technikami (ELISA) była bardzo wysoka. Jednakże, nie wyklucza się zakłóceń w wykonywaniu testu.
- Jeśli ilość dodanej próbki do okienka testu jest za duża, zamiast linii czerwonej i niebieskiej, może pojawić się linia brązowa, a linia kontrolna i linia testu może w ogóle się nie pojawić, ze względu na niepoprawną chromatografię. Brązowa linia nie ma żadnej wartości diagnostycznej. W sytuacji, gdy brązowa linia się pojawi, należy powtórzyć przeprowadzenie testu z użyciem mniejszej ilości próbki kału, lub rozcieńczyć uprzednio przygotowany ekstrakt.
- Badania wykazały, że nie występują żadne reakcje krzyżowe z innymi substancjami. Wynik negatywny nie wyklucza całkowicie występowania zainfekowania *Cryptosporidium parvum* i *Giardia lamblia*. Ważność wyników powinna zostać oceniona w odniesieniu do klinicznych symptomów pacjenta.
- W wypadku wykazania przez test niejednoznacznego wyniku tj. linia w obszarze testowym posiada nieprecyzyjny kolor, badanie należy powtórzyć. Jeżeli w kolejnych próbach sytuacja się powtarza, analizę próbki należy wykonać innymi metodami.

13. Charakterystyka testu

CZUŁOŚĆ I SWOISTOŚĆ

Test 1 – Jako produkt porównań wykorzystano test ELISA (ze znakiem CE). Test NADAL® Giardia-Crypto Combo został oceniony na podstawie wyników badań na obecność antygenów *Cryptosporidium* uzyskanych za pomocą produktu ELISA ze znakiem CE. Rezultaty przedstawiają się następująco:

	Ridascreen Crypto ELISA		Suma
	+	--	
NADAL® Crypto	19	0	19
test kasetowy	8	53	61
Suma	27	53	80

Współczynnik zgodności: 100% [(19+53)/80] = 90,0 %

Oszacowany współczynnik czułości: 100% [19/(19+8)] = 70,4 % *

Oszacowany współczynnik swoistości: 100% [53/(0+53)] > 99,9 %

* Za pomocą PCR przebadano i określono jako negatywne 8 różnych próbek w celu określenia DNA *Cryptosporidium*

Test 2 – Jako technikę porównawczą wykorzystano wykrywanie pasożytów za pomocą mikroskopu. Test NADAL® Giardia-Crypto Combo został oceniony na podstawie wyników badań mikroskopowych na obecność antygenów *Cryptosporidium*. Rezultaty przedstawiają się następująco:

	Badania mikroskopowe		Suma
	+	--	
NADAL® Crypto	15	0	15
test kasetowy	0	54	54
Suma	15	54	69

Współczynnik zgodności: 100% [(15+54)/69] > 99,9 %

Oszacowany współczynnik czułości: 100% [15/(15+0)] > 99,9 %

Oszacowany współczynnik swoistości: 100% [54/(0+54)] > 99,9 %

Test 3 – Jako produkt porównań wykorzystano test ELISA (ze znakiem CE). Test NADAL® Giardia-Crypto Combo został oceniony na podstawie wyników badań na obecność antygenów *Cryptosporidium* uzyskanych za pomocą badania metodą ELISA.

	Ridascreen Giardia ELISA		Suma
	+	--	
NADAL® Giardia	26	0	26
test kasetowy	1	53	54
Suma	27	53	80

Współczynnik zgodności: 100% [(26+53)/80] > 98,8 %

Oszacowany współczynnik czułości: 100% [26/(26+1)] > 96,3 %

Oszacowany współczynnik swoistości: 100% [53/(0+53)] > 99,9 %

Test 4 - Jako technikę porównawczą wykorzystano wykrywanie pasożytów za pomocą mikroskopu. Test NADAL® Giardia-Crypto Combo został oceniony na podstawie wyników badań mikroskopowych na obecność antygenów *Giardia*. Rezultaty przedstawiają się następująco:

	Badania mikroskopowe		Suma
	+	--	
NADAL® Giardia	15	0	16
test kasetowy	0	53	53
Suma	15	53	69

Współczynnik zgodności: 100% [(15+53)/69] > 98,5 %

Oszacowany współczynnik czułości: 100% [15/(15+0)] > 99,9 %

Oszacowany współczynnik swoistości: 100% [53/(0+53)] > 98,1 %

POWTARZALNOŚĆ – PRECYZJA TESTU

Badania czułości testu z tej samej serii wykonano pięciokrotnie otrzymując te same wyniki.

REPRODUKTYWNOŚĆ

Dokładność INTER-DAY

Używając tej samej partii produktu, czterokrotnie dokonywano badania czułości testu w kolejnych 10 dniach. Wykryto jedynie niewielkie (poniżej 1:2) różnice rozcieńczenia, które są akceptowane dla techniki immunochromatograficznej.

Dokładność INTER-LABORATORY

Skoordynowane badania jednakowych próbek zostały przeprowadzone jednocześnie przez trzech różnych techników laboratoryjnych. Wykryto jedynie niewielkie (poniżej 1:2) różnice rozcieńczenia, które są akceptowane dla techniki immunochromatograficznej.

Dokładność INTER-LOT

Określenie krzywej czułości było dokonywane podwójnie z wykorzystaniem trzech różnych partii produktu. Badania dokonywane były przez tę samą osobę, tego samego dnia. Wykryto jedynie niewielkie (poniżej 1:2). różnice rozcieńczenia, które są akceptowane dla techniki immunochromatograficznej.

Effekt Hooka

Podczas badania brak było dostępnej koncentracji standardowej. Jednakże, analiza krzywej czułości opartej na maksymalnej możliwej koncentracji antygenu nie wykazały istnienia efektu Hooka.

REAKCJE KRZYŻOWE Z SUBSTANCJAMI

Poniżej przedstawiono substancje, wraz z wartością stężenia, które nie wpływają na zakłócenie wyniku testu. Badanie wykonano produktami tej samej partii.

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)
Metronidazole	1,2 mg/ml

REAKCJE KRZYŻOWE Z MIKROORGANIZMAMI

Mikroorganizmy przedstawione poniżej nie wpływają na zakłócenie wyniku testu.

Bakterie/Pasożyty/Wirusy

Adenowirus
Astrowirus
Blastocystis hominis
Campylobacter jejuni
Chilomastix mesnili
Endolimax nana
Giardia lamblia
Entamoeba coli
Helicobacter pylori
huevos de *Taenia spp*
Iodamoeba bütschlii
Rotavirus

14. Literatura

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

REF 2012-07-09 MW



nal von minden GmbH

Carl-Peschken-Straße 9
47441 Moers
Germany

Friedenstraße 32
D-93053 Regensburg
Germany

Tel.: 0049 941 29010-0
Fax: 0049 941 29010-50

info@nal-vonminden.com
www.nal-vonminden.com

Directors:
Sandra von Minden
Roland Meißner
Thomas Zander

Commercial reg.: HRB 5679
VAT-ID-Nr.: DE 189 016 086
Tax-No: 244/133/00130






IBAN: DE98750500000840017073
BIC: BYLADEM1RBG
Bank: Sparkasse Regensburg






Point of Care Tests

Lab Assay Products

Lab Services

About us

Symbol	English	Deutsch	Français	Nederlands	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Gebruiksaanwijzing	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
CE	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conform Europeese richtlijnen	Conformidad europea	Conformità europea
IVD	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	In vitro diagnostisch gebruik	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
REF	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Catalogus nummer	Número de catálogo	Numero di Catalogo
LOT	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Lot nummer	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Geschikt voor <n> tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungs-temperatur	Température de conservation	Opslag temperatuur	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Houdbaarheidsdatum	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Str. 9 D-47441 Moers	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Str. 9 D-47441 Moers	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Str. 9 D-47441 Moers	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Str. 9 D-47441 Moers	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Str. 9 D-47441 Moers	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Str. 9 D-47441 Moers
Cont.	Content	Inhalt	Conditionnement	Inhoud	Contenido	Contenuto

Symbol	Polski	Suomi	Portugues	Dansk	Svenska	Česky
	Patrz: ulotka informacyjna	Katso käyttöohjeet	Consulte as instruções de utilização	Se brugsanvisning	Se bruksanvisningen	Čtěte návod k použití
CE	Znak zgodności CE	CE-merkitty	Conformidade com as normas europeias	Europeaisk overensstemmelse	Europeisk överensstämmelse	CE certifikát
IVD	Tylko do użytku in-vitro	In vitro-diagnostiikka	Diagnóstico in vitro	In vitro diagnostik	In vitro diagnostik	In vitro diagnostikum
REF	Numer katalogowy	Luettelo-numero	Catálogo n.º	Katalognummer	Katalognummer	Katalogové č.
LOT	Numer serii	Eränumero	No do lote	Lot nummer	Batchnummer	Číslo šarže
	Wystarczające na "n" powtórzeń	Sisältää tarvikkeet "n" testiin		Indeholder tilstrækkeligt til "n" test	Innehåller tillräckligt till "n" tester	Stačí pro „n“ testování
	Temperatura przechowywania	Säilytyslämpötila	Temperatura de conservação	Opbevarings-temperatur	Förvaringstemperatur	Teplota skladování
	Data ważności	Viimeinen käyttöpäivä	Prazo de validade	Udløbsdato	Utgångsdatum	Minimální datum trvanlivosti
	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Str. 9 D-47441 Moers	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Str. 9 D-47441 Moers	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Str. 9 D-47441 Moers	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Str. 9 D-47441 Moers	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Str. 9 D-47441 Moers	nal von minden GmbH Carl-Peschken-Str. 9 D-47441 Moers
Cont.	Zawartość	Sisältö	Conteúdo	Indhold	Innehåll	Obsah



nal von minden GmbH
Carl-Peschken-Straße 9
47441 Moers
Germany

www.nal-vonminden.com