

RIDA[®] QUICK
Cryptosporidium/Giardia Combi

Art. n.º N1123



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Alemanha
Phone: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Finalidade

Para diagnóstico *in vitro*. O RIDA[®]QUICK Cryptosporidium/Giardia Combi é um teste rápido imunocromatográfico para a comprovação qualitativa de *Cryptosporidium parvum* e / ou *Giardia lamblia* nas amostras de fezes.

2. Resumo e explicação do teste

Giardia lamblia pertence aos flagelos intestinais. Os trofozoites caracteristicamente morfológicos sobrevivem somente por pouco tempo fora do organismo hospedeiro. Os cistos altamente infecciosos servem para a transmissão. Devido à sua grande presença mundial, a *Giardia lamblia* é uma importante causa de doenças diarréicas, especialmente em questões da medicina de viagem. A infecção aparece após a absorção de cistos em alimentos e água contaminados. Em instalações comunitárias com higiene insuficiente a infecção ocorre principalmente por via fecal-oral de pessoa para pessoa. Esta via de transmissão ocorre muito frequentemente em jardins de infância e creches, bem como em homossexuais masculinos e prisioneiros. Os pais, por sua vez, podem ser infeccionados pelos filhos. Ao contrário das crianças pequenas, as crianças mais velhas infeccionadas não demonstram sintomas. Porém, os cistos se destacam e podem infeccionar outras pessoas. A Giardiasis (Lambliasis) aparece como diarreia crônica ou aguda. O tempo de incubação é de 3 a 42 dias. O método para diagnosticar a Giardiasis mais usado no passado foi a comprovação microscópica de cistos nas fezes, sendo para isso necessário utilizar pessoal experiente. Os exames devem, além disso, serem feitos por um período de tempo mais longo, pois a separação dos cistos sofre fortes desvios.

Cryptosporidium parvum é um parasita muito comum nos animais e também é um germe importante também presente nos animais domésticos, principalmente em vitelos. Ao contrário do que se pensava antes, também são observadas infecções em humanos em muitos países. O parasita causa muito frequentemente diarreias endêmicas e epidêmicas em crianças de países em desenvolvimento. Em pacientes imunocompetentes, a doença se manifesta como uma gastroenterite autolimitada. A diarreia dura de 3 a 10 dias e pode ser acompanhada de febre e sintomas gastrointestinais, como vômitos e dores, que são similares aos da Giardiasis (Lambliasis). Mais graves são os sintomas e consequências em pacientes imunoincompetentes, nos quais as diarreias são muito graves e persistentes. A transmissão da infecção pode ser feita do animal para o humano através de água contaminada, mas também de humano para humano. Os membros de instalações comunitárias, crianças nos jardins de infância, bem como os grupos de risco dos homossexuais e portadores de HIV estão especialmente expostos ao risco. O método mais usado no passado para diagnosticar a cryptosporidiosis foi a comprovação microscópica de oocistos nas fezes ou o exame microscópico das amostras biópsicas do intestino delgado, sendo necessário pessoal experiente para ambos.

Um método alternativo importante ao método microscópico tanto para a comprovação de *Giardia lamblia* como de *Cryptosporidium parvum* é o teste rápido imunocromatográfico descrito a seguir, que na sua sensibilidade e especificidade através da utilização de anticorpos monoclonais, é igual aos exames microscópicos. A execução é fácil e rápida e não é necessário utilizar pessoal com formação microbiológica.

3. Princípio do teste

O teste rápido disponível é um teste Lateral-Flow imunocromatográfico, no qual anticorpos específicos dispostos contra ambos os parasitas são acoplados a partículas de látex vermelhas (específicas para *Giardia*) ou azuis (específicas para *Cryptosporidium*). Outros anticorpos específicos contra ambos os agentes patogênicos são ligados firmes na membrana. Depois a amostra de fezes é suspensa no tampão de extração e então sedimentada. Uma parte do supernatante claro da amostra é colocada na tira de teste, sendo que esta então passa pela membrana com as partículas coloridas de látex, às quais em caso positivo o antígeno disponível se liga, e se une às tiras de captação específicas. Dependendo do antígeno disponível, na amostra é então visível uma tira azul e/ou vermelha.

4. Conteúdo da embalagem

Os reagentes de uma embalagem são suficientes para 20 doses

Cassette	20 doses	20 cartuchos de teste embalados individualmente
Diluent	26 ml	Tampão de extração, pronto para o uso; contém 0,1 % Azida de sódio
Pipet	25 unidades	Saco com 25 pipetas descartáveis

5. Reagentes e a sua armazenagem

A embalagem pode ser armazenada a 2 – 30 °C e deve ser usada até a data de expiração impressa. Após a expiração da data de validade, nenhuma garantia de qualidade pode ser oferecida. Do mesmo modo, a capacidade de uso dos cartuchos não pode mais ser garantida se a embalagem dos cartuchos individuais estiver danificada.

6. Reagentes e equipamentos adicionais necessários

- Tubo de amostra para suspensão de fezes
- Mixer Vortex (opcional)
- Micropipeta (200 µl – 1000 µl)
- Contentor para lixo com uma solução de hipocloreto de sódio de 0,5 %

7. Medidas de precaução

Para diagnóstico *in vitro*

Este teste só deve ser efetuado pelo pessoal de laboratório instruído. As regras de trabalho nos laboratórios médicos devem ser observadas. As instruções de uso para a execução do teste devem ser estritamente observadas.

O tampão de diluição de amostra contém azida de sódio como conservante. Evitar o contato com a pele ou com as mucosas.

Não pipetar as amostras ou reagentes com a boca, evitar o contato com a pele ferida ou mucosas. Durante o manejo de amostras, deve usar luvas descartáveis e, após o término do teste, deve-se lavar as mãos. Nas áreas, nas quais se trabalha com as amostras, não fumar, comer ou beber.

Todos os materiais e reagentes, que vêm junto com as amostras potencialmente infecciosas, devem ser manejados com desinfetantes adequados (p. ex. hipocloreto de sódio) antes da eliminação ou autoclavados pelo menos 1 hora a 121 °C.

8. Coleta e armazenagem das amostras

As amostras de fezes devem ser colectadas em frascos limpos sem aditivos e armazenadas antes do teste a 2 – 8 °C. No caso de uma armazenagem de mais de 3 dias, a amostra deve ser congelada a - 20 °C. Neste caso, a amostra é descongelada totalmente antes do teste e exposta a temperatura ambiente. Deve-se evitar um congelamento e descongelamento repetido das amostras.

Se coletas anais forem utilizadas, deve-se observar que material de fezes suficiente (aprox. 50 mg) esteja disponível para o teste.

9. Execução do teste

9.1. Generalidades

Antes da utilização, as amostras, o tampão de extração e o cartucho do teste devem ser colocados em temperatura ambiente (20 – 25 °C). Os cartuchos de teste só devem ser retirados um pouco antes da utilização abrindo a embalagem. Os cartuchos não podem ser usados mais de uma vez. A luz do sol direta durante a execução do teste deve ser evitada.

O reagente restante não deve ser colocado de volta nos vasos, pois isto pode levar a uma contaminação.

9.2. Preparação das amostras

Em um tubo de amostra marcado, é colocado 1 ml de tampão de extração **Diluent**. No caso de amostras de fezes **líquidas**, 100 µl destas (um pouco acima do segundo espessamento) com a pipeta descartável **Pipet** no tampão disponível. No caso de amostras de fezes **sólidas**, 50 mg são suspensos no tampão. Depois, a amostra deve ser bem homogenizada. Isto é feito através de absorção múltipla e batida da suspensão com a pipeta descartável **Pipet** ou alternativamente através da mistura em um mixer Vortex. Depois, deixar sedimentar a suspensão homogênea pelo menos **3 minutos** até que se forme um supernatante claro.

9.3. Teste das amostras

O cartucho de teste **Cassette** retirado da embalagem é depositado em uma superfície plana. Depois são pipetados do supernatante claro da suspensão de fezes 200 µl através da micropipeta ou 4 gotas com a pipeta descartável **Pipet** no orifício redondo do cartucho de teste. Deve-se observar que o líquido passe sem problemas pela membrana. As eventuais partículas pipetadas junto, que possam causar problemas, devem ser retiradas antes. Após **5 minutos** o resultado do teste deve ser lido.

10. Controle de qualidade – Sinais de expiração do reagente

O teste só deve ser avaliado se a tira de teste estiver intacta **antes** da pipetagem da suspensão de amostras produzida e não se pode ver modificações ou titras coloridas. Além disso, **após** a incubação do teste, pelo menos a tira de controle **verde** deve ser visível. Se ela não aparece, antes de repetir o teste deve-se verificar o seguinte:

- Durabilidade dos cartuchos de teste e do tampão de extração utilizado
- Execução correta do teste
- Contaminação do tampão de extração

Se após a repetição do teste com um novo cartucho de teste a tira de controle não for visível, entre em contato com o fabricante.

11. Avaliação e interpretação

Só podem aparecer três tiras, vistas da posição de coleta da amostra na seguinte sequência: uma azul (T₁ = tira de teste 1), uma vermelha (T₂ = tira de teste 2) e uma verde (C = tira de controle). **Se faltar a tira de controle verde o teste não é avaliável e é inválido !**

As seguintes interpretações são positivas:

- **Cryptosporidium positivo** : tiras **azul** e **verde** são visíveis.
- **Giardia positivo** : tiras **vermelha** e **verde** são visíveis.
- **Cryptosporidium e Giardia positivo** : tiras **azul**, **vermelha** e **verde** são visíveis.
- **Negativo** : somente a tira **verde** é visível.
- **Inválido** : nenhuma tira visível ou uma constelação diferente daquela descrita, bem como outras colorações nas tiras. Do mesmo modo, as colorações das tiras que só aparecem após 10 minutos ou depois não têm valor diagnóstico e não devem ser avaliadas.

12. Limites do método

O RIDA[®]QUICK Cryptosporidium/Giardia Combi comprova antígenos de Cryptosporidium parvum e / ou Giardia lamblia nas amostras de fezes. Uma relação entre a intensidade das tiras específicas visíveis e dos sintomas presentes ou altamente clínicos não pode ser ignorada aqui. **Os resultados alcançados devem sempre ser interpretados em conjunto com o quadro clínico.**

Um resultado **positivo** não exclui a presença de outros agentes patogênicos.

Um resultado **negativo** não exclui uma possível infecção com Cryptosporidium ou Lamblia. Ele pode ter sido causado pela segregação do agente patogênico ou por uma quantidade muito pequena de antígeno na amostra. Se houver de forma anamnésica a suspeita fundada de uma infecção com o agente patogênico procurado, uma outra amostra de fezes do paciente deve ser examinada.

Uma quantidade demasiada de amostra de fezes pode causar tiras marrons ao invés das tiras coloridas com as cores específicas. Estas tiras marrons não têm valor diagnóstico. Nestes casos, é necessário fazer um novo teste com uma quantidade menor de fezes ou uma outra diluição da suspensão já preparada (supernatante claro após a sedimentação), para verificar se o agente patogênico procurado está na amostra ou se foi introduzido em excesso através de quantidade demasiada de matriz de fezes.

13. Características de desempenho

13.1. Estudo clínico comparativo

Em um laboratório de rotina, foi feito um exame comparativo, tanto em amostras de fezes frescas como em amostras congeladas, entre RIDA[®]QUICK Cryptosporidium/Giardia Combi e a microscopia ali estabelecida com 70 amostras de fezes (respectivamente 15 Cryptosporidium parvum positivos e Giardia positivos bem como 40 amostras negativas para cada agente patogênico). Os resultados estão resumidos na tabela 1 e 2.

Tab. 1: Comparação do RIDA[®]QUICK Cryptosporidium/Giardia Combi com microscopia na avaliação exclusiva das tiras específicas do Cryptosporidium

		RIDA [®] QUICK Cryptosporidium/Giardia Combi	
		+	-
Microscopia	+	14	1
	-	0	40

Sensibilidade : 93,8 %

pos. Valor previsto : 100,0 %

Especificidade: 100,0 %

neg. Valor previsto : 97,5 %

Tab. 2: Comparação do RIDA[®]QUICK Cryptosporidium/Giardia Combi com microscopia na avaliação exclusiva das tiras específicas do Giardia

		RIDA [®] QUICK Cryptosporidium/Giardia Combi	
		+	-
Microscopia	+	15	0
	-	2	38

Sensibilidade : 100,0 %

pos. Valor previsto : 88,2 %

Especificidade: 95,2 %

neg. Valor previsto : 100,0 %

13.2. Atividade cruzada

Nenhum dos parasitas intestinais descritos abaixo levaram a uma reação cruzada em RIDA®QUICK Cryptosporidium/Giardia Combi:

Entamoeba coli

Blastocystis hominis

Jodamoeba bütschlii

Chilomastix mesnili

Endolimax nana

Ovos de *Taenia* spp.

Literatura

1. Black, R. E. et al.: Giardiasis in day-care centers: Evidence of person-to-person transmission. *Pediatrics* 60 (No. 4), 486 - 491 (1977).
2. Craun, G. F.: Waterborne Giardiasis in the United States: A review. *Am. J. Pub. Health* 69 (No. 8), 817 - 819 (1979).
3. Nask, T. E. et al.: Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis.* 156 (No. 6), 974 - 984 (1987).
4. Smith, H. V. et al.: *Giardia* and Giardiasis: What's in a name? *Microbiol. Eur.* 3 (No. 1), 22 - 29 (1995).
5. Thompson, R. C. A., Reynoldson, J. A.: *Giardia* and Giardiasis. *Adv. Parasitol.* 32, 71 – 160 (1993)
6. Xiao, L.: *Giardia* infection in farm animals. *Parasitology today* 10 (No. 11), 436 - 438 (1994).
7. Schunk, M. et al.: Detection of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* in stool samples by two enzyme immunoassays. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20, 389 – 391 (2001)
8. Clavel, A.: Evaluation of the optimal number of fecal specimens in the diagnosis of cryptosporidiosis in AIDS and immunocompetent patients. *Eur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14, 46-49 (1995).
9. Current, W. L., Garcia, L. S.: Cryptosporidiosis. *Clinics in Laboratory Medicine* 11 (No. 4), 873 - 895 (1991).
10. Current, W. L., Garcia, L. S.: Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4 (No. 3), 325 - 358 (1991).
11. Flanigan, T. P.: Human immunodeficiency virus infection and cryptosporidiosis: Protective immune responses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50 (5) Suppl., 29 - 35 (1994).
12. Guarino, A. et al.: Human intestinal cryptosporidiosis: secretory diarrhea and enterotoxic activity in Caco-2 cells. *J. Infect. Dis.* 171, 976 - 983 (1995).
13. Hayes, E. B. et al.: Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. *New. Engl. J. Med.* 320 (No. 21), 1372 - 1376 (1989).
14. Le Chevallier, M. W. et al.: *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in filtered drinking water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (No. 9), 2617 - 2621 (1991).
15. Mc. Anulty, J. M. et al.: A community wide outbreak of cryptosporidiosis associated with swimming at a wave pool. *Jama* 272 (No. 20), 1597 - 1600 (1994).