

RIDA[®] QUICK Cryptosporidium

Art. No.: N1203



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Anwendungsbereich

Für die *in vitro* Diagnostik. Der RIDA®QUICK Cryptosporidium ist ein immunchromatografischer Schnelltest zum qualitativen Nachweis von *Cryptosporidium parvum* in Stuhlproben.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Cryptosporidium parvum ist ein Parasit, der bei Tieren weit verbreitet ist und als wichtiger pathogener Keim auch bei Haustieren, besonders bei Kälbern, vorkommt. Häufiger als früher angenommen werden aber auch Infektionen des Menschen in vielen Ländern beobachtet. Der Parasit verursacht vielfach bei Kindern in tropischen Entwicklungsländern endemische und epidemische Diarrhöen. Bei immunkompetenten Patienten manifestiert sich die Erkrankung als selbstheilende Gastroenteritis. Die Diarrhö dauert zwischen 3 und 10 Tagen und kann von Fieber und gastro-intestinalen Symptomen wie Übelkeit und Schmerzen begleitet werden, die denen der Giardiasis (Lambliasis) ähneln. Wesentlich schwerwiegender sind die Symptome und Auswirkungen bei immuninkompetenten Patienten, bei denen die Diarrhöen sehr schwer verlaufen und persistieren. Die Übertragung der Infektion kann vom Tier auf den Menschen durch kontaminiertes Wasser, aber auch von Mensch zu Mensch erfolgen. Die Mitglieder von Gemeinschaftseinrichtungen, Kinder im Kindergarten sowie die Risikogruppen der homosexuellen Männer und der HIV-Infizierten sind besonders gefährdet. Die in der Vergangenheit am häufigsten angewandte Methode zur Diagnose der Cryptosporidiose waren der mikroskopische Nachweis von Oozysten im Stuhl bzw. die mikroskopische Untersuchung von Dünndarm-Biopsieproben, wofür erfahrenes Personal zur Verfügung stehen musste. Eine wichtige Alternativmethode zur Mikroskopie, für den Nachweis von *Cryptosporidium parvum* ist der nachfolgend beschriebene immunchromatografische Schnelltest, der in seiner Sensitivität und Spezifität durch die Verwendung monoklonaler Antikörper den mikroskopischen Untersuchungsverfahren ebenbürtig ist. Die Durchführung ist einfach und schnell und es wird kein speziell mikrobiologisch ausgebildetes Personal benötigt.

3. Testprinzip

Der vorliegende Schnelltest ist ein einstufiger immunchromatografischer Lateral-Flow Test, bei dem gegen *Cryptosporidium parvum* gerichtete spezifische Antikörper an rote Latexpartikel gekoppelt sind. Weitere spezifische Antikörper gegen den Erreger sind fest auf der Membran gebunden. Zunächst wird die Stuhlprobe im Extraktionspuffer suspendiert und anschließend sedimentiert. Ein Aliquot des klaren Überstandes der Probe wird auf den Teststreifen gebracht, wobei diese dann mit den farbigen Latexpartikeln, an die sich im positiven Falle vorhandenes Antigen bindet, durch die Membran läuft und an der spezifischen Fängerbande gebunden wird.

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 20 Bestimmungen

Cassette	20 Best.	20 einzeln verpackte Testkassetten
Diluent	26 ml	Extraktionspuffer, gebrauchsfertig; enthält 0,1 % Natriumazid
Pipet	25 Stck.	Beutel mit 25 Einwegpipetten

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Packung kann bei 2 – 30 °C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendungsfähig. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden. Ebenso kann eine Verwendungsfähigkeit von Kassetten dann nicht mehr gewährleistet werden, wenn die Umverpackung der einzelnen Kassetten beschädigt ist.

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

- Probenröhrchen für Stuhlsuspension
- Röhrchen (optional: unbeschichtete Mikrotiterwells) für Überstand der Suspension
- Vortexmischer (optional)
- Mikropipette (200 µl – 1000 µl)
- Abfallbehälter mit einer 0,5 %igen Natrium-Hypochloritlösung

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Der Probenverdünnungspuffer enthält als Konservierungsmittel Natriumazid. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren, Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Während des Umgangs mit Proben Einmal-Handschuhe tragen und

nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In den Bereichen, in denen mit den Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, müssen genau wie diese mit geeigneten Desinfektionsmitteln (z.B. Natrium-Hypochlorit) behandelt oder mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

Stuhlproben sind in sauberen Behältern ohne irgendwelche Zusätze zu sammeln und vor Testbeginn bei 2 – 8 °C zu lagern. Bei Lagerung von mehr als 3 Tagen muss die Probe bei - 20 °C eingefroren werden. In diesem Fall wird die Probe vor Testbeginn vollständig aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Probe ist zu vermeiden.

Wenn rektale Abstriche eingesetzt werden sollen, ist darauf zu achten, dass genügend Stuhlmaterial (ca. 50 mg) zur Testdurchführung vorhanden ist.

9. Testdurchführung

9.1. Allgemeines

Vor Verwendung sind die Proben, der Extraktionspuffer sowie die Testkassetten auf Raumtemperatur (20 – 25 °C) zu bringen. Die Testkassetten sollen erst kurz vor Verwendung durch Aufreißen der Umverpackung entnommen werden. Einmal benutzte Kassetten dürfen nicht wiederverwendet werden. Direkte Sonneneinstrahlung während der Testdurchführung ist zu vermeiden.

Überschüssiges Reagenz darf nicht wieder in die Gefäße zurückgegeben werden, da dies zu einer Kontamination führen kann.

9.2. Vorbereitung der Proben

In ein gekennzeichnetes Teströhrchen wird 1 ml Extraktionspuffer **Diluent** vorgelegt. Im Falle **flüssiger** Stuhlprobe werden mit der Einwegpipette **Pipet** 100 µl (bis kurz oberhalb der zweiten Verdickung) davon im vorgelegten Puffer suspendiert. Bei **fester** Stuhlprobe werden 50 mg im Puffer suspendiert. Anschließend muss die Probe gut homogenisiert werden. Dies erfolgt entweder durch mehrfaches Aufsaugen und Ausstoßen der Suspension mit der Einwegpipette **Pipet** oder alternativ durch Mischen auf einem Vortexmischer. Danach die homogene Suspension mindestens **3 Minuten** sedimentieren lassen bis sich ein klarer Überstand bildet.

9.3. Proben-Testung

Die der Umverpackung entnommene Testkassette **Cassette** wird auf eine ebene Unterlage gelegt. Anschließend werden vom klaren Überstand der Stuhlsuspension 200 µl mittels Mikropipette oder 4 Tropfen mit der Einwegpipette **Pipet** in die runde Öffnung der Testkassette pipettiert. Es ist darauf zu achten, dass die Flüssigkeit ungehindert durch die Membran läuft. Eventuell mitpipettierte Partikel, die dies behindern können, sind vorher zu entfernen. Nach **5 Minuten** kann das Testergebnis abgelesen werden.

10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Der Test ist nur auszuwerten, wenn die Testkassette **vor** dem Einpipettieren der Proben-suspension unversehrt ist und keine farbigen Veränderungen oder Banden darauf zu sehen sind. Ferner muss **nach** der Testinkubation mindestens die **blaue** Kontrollbande sichtbar sein. Erscheint diese nicht, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der Testkassetten und des verwendeten Extraktionspuffers
- Korrekte Testdurchführung
- Kontamination des Extraktionspuffers

Ist danach bei Wiederholung des Tests mit einer neuen Testkassette die Kontrollbande wiederum nicht sichtbar, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm Distributeur.

11. Auswertung und Interpretation

Es dürfen maximal zwei Banden erscheinen, von der Probenaufnahmestelle gesehen in folgender Reihenfolge: Eine rote Reaktionsbande und eine blaue Kontrollbande. **Fehlt die blaue Kontrollbande ist der Test nicht auswertbar und ungültig!**

Folgende Interpretationen sind möglich:

- **Cryptosporidium positiv** : die **rote** und **blaue** Bande sind sichtbar.
- **Cryptosporidium negativ** : nur die **blaue** Bande ist sichtbar.
- **Ungültig** : keine Bande ist sichtbar oder eine andere Konstellation als oben beschrieben sowie andere Verfärbungen der Banden. Ebenso sind Banden-Verfärbungen, die erst nach 10 Minuten oder später auftreten ohne diagnostischen Wert und nicht zu beurteilen.

12. Grenzen der Methode

Der RIDA®QUICK Cryptosporidium weist Antigen von Cryptosporidium parvum in Stuhlproben nach. Ein Zusammenhang zwischen der Intensität der sichtbaren spezifischen Bande und dem Auftreten oder der Schwere klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. **Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem klinischen Bild zu interpretieren.**

Ein **positives** Ergebnis schließt die Anwesenheit anderer infektiöser Erreger nicht aus.

Ein **negatives** Ergebnis schließt eine mögliche Kryptosporidiose nicht aus. Es kann durch intermittierende Ausscheidung der Erreger oder durch eine zu geringe Antigenmenge in der Probe verursacht sein. Besteht anamnestisch der begründete Verdacht auf eine Infektion mit dem gesuchten Erreger, sollte eine weitere Stuhlprobe des Patienten untersucht werden.

Ein Überschuss an Stuhlprobe kann bräunliche Banden verursachen anstelle der spezifisch gefärbten Banden. Diese bräunlichen Banden haben keinen diagnostischen Wert. In solchen Fällen ist eine erneute Testung mit einer geringeren Stuhlmenge oder einer weiteren Verdünnung der bereits hergestellten Suspension (klarer Überstand nach Sedimentation) erforderlich, um zu klären, ob der gesuchte Erreger doch in der Probe ist und durch zuviel eingesetzte Stuhlmatrix überlagert wurde.

13. Leistungsmerkmale

13.1. Klinische Vergleichsstudie

In einem Routinelabor wurde sowohl an tiefgefrorenen wie an frischen Stuhlproben eine Vergleichsuntersuchung zwischen dem RIDA®QUICK Cryptosporidium und der dort etablierten Mikroskopie mit insgesamt 55 Stuhlproben durchgeführt (15 Cryptosporidium parvum-positive sowie insgesamt 40 negative Stuhlproben). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Vergleich des RIDA®QUICK Cryptosporidium mit Mikroskopie

		RIDA®QUICK Cryptosporidium	
		+	-
Mikroskopie	+	14	1
	-	0	40

Sensitivität: 93,8 %

pos. Vorhersagewert: 100,0 %

Spezifität: 100,0 %

neg. Vorhersagewert: 97,5 %

13.2. Kreuzreaktivität

Keine der nachfolgend aufgeführten Darmparasiten führten zu einer Kreuzreaktion im RIDA®QUICK Cryptosporidium:

Entamoeba coli

Blastocystis hominis

Jodamoeba bütschlii

Chilomastix mesnili

Endolimax nana

Eier von *Taenia* spp.

Literatur

1. 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).
2. Current, W. L., Garcia, L. S.: Cryptosporidiosis. *Clinics in Laboratory Medicine* 11 (No. 4), 873 - 895 (1991).
3. Current, W. L., Garcia, L. S.: Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4 (No. 3), 325 - 358 (1991).
4. Flanigan, T. P.: Human immunodeficiency virus infection and cryptosporidiosis: Protective immune responses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50 (5) Suppl., 29 - 35 (1994).
5. Guarino, A. et al.: Human intestinal cryptosporidiosis: secretory diarrhea and enterotoxic activity in Caco-2 cells. *J. Infect. Dis.* 171, 976 - 983 (1995).
6. 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).
7. Le Chevallier, M. W. et al.: Giardia and Cryptosporidium spp. in filtered drinking water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (No. 9), 2617 - 2621 (1991).
8. 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).

