

RIDA[®] QUICK
Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi

Art. No.: N1723



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



1. Campo di applicazione

Per diagnostica *in vitro*. Il RIDA[®]QUICK Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi è un test rapido immunocromatografico per la rilevazione qualitativa di *Cryptosporidium parvum* e/o *Giardia lamblia* e/o *Entamoeba histolytica* (sensu lato) in campioni di feci.

2. Sintesi e spiegazione del test

La **Giardia lamblia** appartiene ai flagellati intestinali. I trofozoiti morfologicamente caratteristici sopravvivono al di fuori dell'organismo ospite solo per poco tempo. La trasmissione avviene mediante cisti altamente infettive. A causa della sua diffusione su scala mondiale, il *Giardia lamblia* rappresenta una delle principali cause di affezioni diarroiche croniche, con particolare insorgenza nella medicina da viaggio. L'infezione si manifesta a seguito della ingestione di cisti con alimenti o acqua contaminati. L'infezione avviene prevalentemente in istituzioni comuni con igiene carente, prevalentemente per via fecale-orale da individuo a individuo. Questo canale di trasmissione si riscontra con particolare frequenza nei doposcuola e negli asili, così come negli omosessuali maschi e nei passeggeri rimpatrianti. I genitori possono inoltre essere infettati dai propri bambini. Contrariamente a quanto avviene nei bambini piccoli, i bambini più grandi che hanno contratto l'infezione possono essere asintomatici. Tuttavia le cisti possono aprirsi contagiando altre persone. La Giardiasi (Lambliasi) si manifesta in forma di diarrea acuta o cronica. Il periodo di incubazione è compreso tra 3 e 42 giorni. Nel passato, il metodo diagnostico di maggiore impiego per la Giardiasi era la rilevazione microscopica delle cisti nelle feci, per la quale doveva essere a disposizione personale esperto. Gli esami devono inoltre essere condotti per un periodo di tempo più lungo, in quanto l'apertura delle cisti è soggetta a forti oscillazioni.

Il **Cryptosporidium parvum** è un parassita largamente diffuso negli animali e costituisce uno dei principali germi patogeni anche negli animali domestici, presente in particolare nei vitelli. Tuttavia sempre più spesso rispetto al passato, si riscontrano infezioni anche nell'essere umano in molti stati. Nei bambini dei paesi tropicali in via di sviluppo, il parassita è sovente causa di diarrea endemica ed epidemica. Nei pazienti immunocompetenti l'affezione si manifesta sotto forma di gastroenterite a guarigione spontanea. La diarrea dura dai 3 ai 10 giorni e può essere accompagnata da febbre e sintomi gastro-intestinali quali nausea e nevralgia, simili a quelli della Giardiasi (Lambliasi). I sintomi e le conseguenze sono notevolmente più gravi per i pazienti immunoincompetenti, nei quali la diarrea ha un decorso molto difficile e persistente. L'infezione può essere trasmessa dall'animale all'uomo per mezzo di acqua contaminata, ma anche da uomo a uomo. I membri di istituzioni comuni, i bambini negli asili e i gruppi a rischio di maschi omosessuali e HIV positivi sono i soggetti più esposti. In passato i metodi più spesso impiegati per la diagnosi della criptosporidiosi erano le rilevazioni al microscopio di oocisti nelle feci e l'esame al microscopio di campioni bioptici dell'intestino tenue, per i quali doveva essere a disposizione personale esperto.

Ogni anno, l'**Entamoeba histolytica (sensu lato)** infetta fino a 500 milioni di persone su scala mondiale. Da ricerche di genetica molecolare è emerso che i protozoi, contraddistinti come Entamoeba histolytica mediante tradizionali metodi diagnostici, sono costituiti da due specie morfologicamente non distinguibili, la specie patogena Entamoeba histolytica sensu stricto e, secondo l'attuale stato di conoscenza, la specie apatogena Entamoeba dispar. Si stima che il 90 % delle infezioni da Entamoeba sono provocate dall'E. dispar. I casi annuali causati dalla E. histolytica, sono pari a circa 40 - 50 milioni con colite da ameba o ascesso epatico, con 80.000 decessi.

Il ciclo di vita dell'Entamoeba è relativamente semplice. L'infezione avviene per assunzione orale di cisti a quattro nuclei. Da queste ultime si sviluppa una forma vegetativa mononucleare del parassita nell'intestino tenue, il trofozoita (forma Minuta), che si moltiplica e differenzia soprattutto nel colon. Il processo di incistazione si verifica presumibilmente attraverso l'area intestinale inferiore. I trofozoiti si trovano insieme alle cisti solo nel caso di accelerazione del transito intestinale delle feci.

La sintomatologia clinica di una amebiasi è provocata dall'invasione del parassita dal lume intestinale nella mucosa del colon. In quest'area si trovano spesso trofozoiti con eritrociti fagocitati. Questa forma di trofozoiti è denominata Magna a causa della loro dimensione. A seguito dell'invasione a livello della mucosa intestinale, si verificano affezioni diarroiche, dissenteria o persino amebomi. Come complicanze a seguito di diffusione disseminata, possono verificarsi ascessi epatici, polmonari o, in rari casi, persino ascessi cerebrali, che, se non trattati, provocano nella maggior parte dei casi un decorso mortale.

I sintomi clinici della forma intestinale acuta della amebiasi sono dolori di stomaco crampiformi associati a nausea e forte diarrea con feci contenenti sangue e muco. Lo stadio acuto può trasformarsi in cronico con diarrea occasionale alternata a costipazione, mal di stomaco, nausea e vomito. Sono stati anche descritti portatori di cisti completamente asintomatici.

In circa il 10 % dei casi, una dissenteria da ameba acuta comporta complicanze extraintestinali quali ascessi epatici o coinvolgimento di alcuni organi. Nel caso di amebiasi extraintestinale, esiste l'evidenza sierologica di anticorpi.

La diagnosi dell'amebiasi intestinale può essere condotta per mezzo di tradizionali metodologie microscopiche mediante la rilevazione di cisti e trofozoiti nelle feci. Tuttavia, dato che lo spessore del parassita può essere estremamente esiguo, si presuppone che la sensibilità di questo metodo, nel caso di un singolo esame delle feci, sia pari al 75% anche se eseguito da personale esperto. Inoltre, sussiste il pericolo di scambiare l'entamoeba con cellule epiteliali intestinali, granulociti, macrofagi e funghi.

Procedure di test immunologici sensibili con anticorpi specifici anti antigene della entamoeba, offrono un notevole vantaggio in tale ambito. In tal modo la diagnostica diventa indipendente dalla valutazione soggettiva e più sensibile grazie alla identificazione di componenti anche morfologicamente non più identificabili. Solo la forma invasiva della entamoeba genera la formazione di anticorpi. Dato che i titoli degli anticorpi sono prevalentemente rilevabili contestualmente all'inizio della sintomatologia clinica, per l'identificazione della E. histolytica può

essere impiegato un metodo di rilevazione specifica degli anticorpi. Ciò offre inoltre la possibilità di differenziare, a seconda dell'entità del titolo, tra amebiasi intestinale ed extraintestinale, fattore determinante per la scelta della terapia.

Il test rapido immunocromatografico di seguito descritto rappresenta un importante metodo alternativo alla microscopia, sia per la rilevazione di *Entamoeba histolytica*, sia di *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* ed equivale al metodo di esame microscopico per sensibilità e specificità mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali. L'esecuzione è semplice e rapida e non richiede la presenza di personale specializzato in microbiologia.

3. Principio del test

Il presente test rapido è un test Lateral-Flow immunocromatografico monofase, nel quale anticorpi specifici mirati contro entrambi i rispettivi antigeni parassitari sono accoppiati a particelle di lattice verdi (*Entamoeba*-specifici), rosse (*Giardia* specifici) o blu (*Cryptosporidi* specifici). Altri anticorpi specifici contro i tre agenti patogeni sono saldamente fissati alla membrana. In primo luogo sospendere il campione di feci nel tampone di estrazione e quindi sedimentare. Applicare sulla striscia per test una aliquota di supernatante chiaro di campione che, insieme con le particelle di lattice colorate, alle quali si lega l'antigene presente nei casi positivi, scorre attraverso la membrana per poi legarsi alla banda di raccolta specifica. A seconda dell'antigene presente nel campione sarà visibile una banda verde e/o rossa e/o blu.

4. Contenuto della confezione

I reagenti di una confezione bastano per 20 determinazioni

Cassette	20 Det.	20 cassette per test confezionate singolarmente
Diluent	26 ml	Tampone di estrazione, pronto per l'uso; contiene 0,1 % di azoturo di sodio
Pipet	25 Pezzi	Busta con 25 pipette monocanale

5. Reagenti e relativa conservazione

La confezione può essere conservata a 2 – 30 °C ed è utilizzabile fino alla data di scadenza stampata. Dopo la data di scadenza, non può essere più fornita alcuna garanzia di qualità.

Analogamente, la funzionalità delle cassette non può essere garantita, se l'imballaggio delle singole cassette è danneggiato.

6. Reagenti aggiuntivi necessari - accessori richiesti

- Anse di inoculazione per sospensione fecale
- Miscelatore vortex (opzionale)
- Micropipetta (200 µl – 1000 µl)
- Contenitore di rifiuti con soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5 %

7. Precauzioni

Solo per diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le disposizioni per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso nell'esecuzione del test.

Il tampone di estrazione contiene azoturo di sodio come conservante. Evitare il contatto con la pelle o con le mucose.

Non introdurre con la bocca campioni o reagenti mediante pipetta, evitare il contatto con la cute lesa o con le mucose. Durante la manipolazione dei campioni indossare guanti monouso e lavare le mani dopo aver eseguito il test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.

Tutti i reagenti e materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi devono essere trattati, esattamente come i campioni, prima dello smaltimento, con adeguato disinfettante (ad es. ipoclorito di sodio) o sottoposti a sterilizzazione a vapore per almeno un'ora a 121 °C.

8. Raccolta e deposito dei campioni

I campioni di feci devono essere raccolti in contenitori puliti senza alcuna aggiunta e devono essere conservati prima dell'inizio del test a 2 – 8 °C. In caso di conservazione per più di 3 giorni, il campione deve essere congelato a - 20 °C. In questo caso scongelare completamente il campione prima dell'inizio del test e portare a temperatura ambiente. Evitare il ripetuto congelamento e scongelamento del campione.

Nell'inserimento dei prelievi rettali, assicurarsi che sia presente una quantità sufficiente di materiale fecale (ca. 50 mg) per l'esecuzione del test.

9. Esecuzione del test

9.1. Generalità

Prima dell'utilizzo portare campioni, tampone di estrazione e cassette per test a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Le cassette per test devono essere rimosse dall'imballaggio con apertura a strappo solo poco prima dell'utilizzo. Le cassette usate non possono essere riutilizzate. Evitare l'esposizione diretta all'irradiazione solare durante l'esecuzione del test.

Il reagente in eccesso non deve essere nuovamente riposto nei contenitori, in quanto ciò potrebbe causare contaminazione.

9.2. Preparazione dei campioni

Introdurre in una provetta graduata 1 ml di tampone di estrazione **Diluent**. In caso di campioni di feci **liquide** sospendere 100 µl di campione con la pipetta monocanale **Pipet** (fino a superare di poco il secondo spessore) nell'apposito tampone. In caso di campioni di feci **solide** sospendere 50 mg nel tampone. Quindi omogeneizzare bene il campione. L'omogeneizzazione avviene o per introduzione ed espulsione ripetuta della sospensione mediante la pipetta monocanale o in alternativa miscelando con un miscelatore vortex. Lasciare quindi sedimentare la sospensione omogeneizzata per almeno **3 minuti** fino a quando non si forma un supernatante chiaro.

9.3. Esame dei campioni

Riporre la cassetta **Cassette** per test rimossa dall'imballaggio su superficie piana. Introdurre nell'apertura di inserimento rotonda della cassetta per test 200 µl di supernatante chiaro di sospensione fecale mediante micropipetta o 4 gocce mediante la pipetta monocanale **Pipet**. Assicurarsi che il liquido fluisca liberamente attraverso la membrana. Rimuovere precedentemente eventuali particelle introdotte mediante pipetta che potrebbero ostacolare tale flusso. Il risultato del test può essere letto dopo **10 minuti**.

10. Controllo della qualità - Segni di scadenza dei reagenti

Il test deve essere valutato, solo quando la cassetta per test **prima** della introduzione mediante pipetta della sospensione di campione è intatta e non sono presenti alcune variazioni o striature cromatiche sulla membrana. Inoltre **dopo** l'incubazione del test deve essere visibile almeno la banda di controllo **viola**. Qualora quest'ultima non appaia, prima di ripetere il test occorre verificare quanto segue:

- periodo di conservazione delle cassette per test e del tampone di estrazione utilizzato
- corretta esecuzione del test
- contaminazione del tampone di estrazione

Qualora dopo la ripetizione del test con una nuova cassetta per test la banda di controllo non sia nuovamente visibile, rivolgersi al produttore o al proprio distributore locale R-Biopharm.

11. Valutazione e interpretazione

Devono apparire un massimo di quattro bande, viste nella seguente successione dal punto di prelievo del campione: Una banda blu ("1" = Banda per test 1), una rossa ("2" = banda per test 2) e una verde ("3" = banda di controllo). **Se manca la banda di controllo viola, il test non è valutabile e non è valido!**

Sono possibili le seguenti interpretazioni:

- **Cryptosporidi positivo:** le bande **blu** e **viola** sono visibili.
- **Giardia positivo:** le bande **rossa** e **viola** sono visibili.
- **Entamoeba positivo :** le bande **verde** e **viola** sono visibili.
- Inoltre possono essere visibili anche tutte le combinazioni delle tre bande per test specifiche con la banda di controllo viola, a seconda della presenza dei tre agenti patogeni nel campione.
- **Negativo:** è visibile soltanto la **banda di controllo viola**.
- **Non valido:** nessuna banda è visibile o è presente un'altra combinazione rispetto a quanto sopra descritto o un'altra colorazione delle bande. Analogamente, non hanno valore diagnostico e non sono da valutarsi cambiamenti di colore delle bande che compaiono solo dopo 10 minuti o oltre.

12. Limiti del metodo

Il RIDA[®]QUICK Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi rileva l'antigene di Cryptosporidium parvum e/o Giardia lamblia e/o Entamoeba histolytica (sensu lato) in campioni di feci. Non è possibile dedurre una relazione tra l'intensità delle bande specifiche visibili e l'insorgenza o la gravità della sintomatologia clinica. **I risultati ottenuti devono essere sempre interpretati in relazione al quadro clinico.**

Un risultato **positivo** non esclude la presenza di altri agenti patogeni infettivi.

Un risultato **negativo** non esclude una possibile infezione da cripto sporidi, lamblia o entamoeba. Tale risultato può essere causato dall'espulsione intermittente dell'agente patogeno o dalla quantità troppo scarsa di antigene nel campione. Qualora sussista a livello anamnestico il fondato sospetto di una infezione causata dagli agenti patogeni ricercati, occorre esaminare un ulteriore campione di feci del paziente.

L'eccesso di campioni di feci può causare bande marroni al posto delle bande colorate specifiche. Tali bande marroni non hanno alcun valore diagnostico. In tal caso è necessario eseguire un nuovo test con una minore quantità di feci o con un'ulteriore diluizione della sospensione già prodotta (supernatante chiaro dopo la sedimentazione), per chiarire se gli agenti patogeni ricercati sono comunque nel campione e se sono stati sommersi da un'eccessiva introduzione di matrice fecale.

13. Prestazioni opzionali

13.1. Studio clinico comparato

In uno studio multicentrico con 5 istituzioni diverse sono stati esaminati in totale 252 campioni di feci, predeterminati e congelati con metodi differenti, dopo scongelamento, con il test rapido RIDA®QUICK Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi. I singoli risultati ottenuti sono esposti nella Tabella 1 e la sensibilità e la specificità media sono state calcolate sulla base dei singoli risultati delle 5 sedi di convalida.

Tab.1 Composizione dei risultati di uno studio multicentrico con il test rapido RIDA®QUICK Test rapido Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi

Metodo di riferimento	Campioni				Banda per test specifico per parassiti					
	totale	pos.	negativi		Cryptosporidium		Giardia		Entamoeba	
			nessun parassita	altro	Sens.	Spez.	Sens.	Spez.	Sens.	Spez.
Microscopy	28	28	0	0	87,5	-	80	-	60	-
Microscopy	63	32	20	11	100	100	100	100	-	100
Microscopy	32	12	15	5	-	-	88,9	100	100	80
Microscopy / PCR	49	35	5	9	66,7	79,9	94,4	100	79,2	76
Elisa	80	63	17	0	77,8	100	96,3	98,1	100	93,6
Totale	252	170	57	25	83,0 %	93,3%	91,9%	99,5%	84,8%	87,4%

13.2. Reattività incrociata

Nessuno dei seguenti parassiti intestinali ha comportato una reazione incrociata nel RIDA[®]QUICK Cryptosporidium/Giardia/ Entamoeba Combi:

Entamoeba coli

Blastocystis hominis

Chilomastix mesnili

Endolimax nana

Entamoeba nana

Entamoeba hartmannii

Hymenolepsis nana

Isospora belli

Isospora felis

Jodamoeba bütschlii

Literature

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. Flanagan, 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).
16. Bracha, R. et al.: Differentiation of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* by using specific DNA probes. *Clin. Microbiol.* 28 (No. 4), 680 - 684 (1990).
17. Citronberg, R. J., Semel, J. D.: Severe vaginal infection with *Entamoeba histolytica* in a woman who recently returned from Mexico: Case report and review. *Clin. Infect. Dis.* 20, 700 - 702 (1995).

18. Espinosa-Cantellano, M., Martinez-Palomo, A.: Entamoeba histolytica: Mechanism of surface receptor capping. *Exp. Parasitol.* 79, 424 - 435 (1994).
19. Katzwinkel-Wladarsch, S. et al.: Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic Entamoeba histolytica DNA from stool specimen. *Am. J. Trop. Med.-Hyg.* 51 (1), 115 - 118 (1994).
20. Kean, B. H. et al.: Epidemic of amoebiasis and giardiasis in a biased population. *Brit. J. Ven. Dis.* 55, 375 - 378 (1979).
21. Mannweiler, E.: Immundiagnostik der Amöbiasis. *Der Mikrobiologe* 5. Jg., Heft 6, 194 - 200 (1995).
22. Ohnishi, K. et al.: Brain abscess due to infection with Entamoeba histolytica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51 (2), 180 - 182 (1994).
23. Petter, R. et al.: Characterization of two distinct gene transcripts for ribosomal protein L 21 from pathogenic and nonpathogenic strains of Entamoeba histolytica. *Gene* 150, 181 - 186 (1994).
24. Reed, Sh. L.: New Concepts regarding the pathogenesis of amebiasis. *Clin. Infect. Dis.* 21 (Suppl. 2), 182 - 185 (1995).
25. Strachan, W. D. et al.: Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of Entamoeba histolytica. *Lancet* 12, 561 - 563 (1988).
26. van Lunzen, J., Tannich, E., Burchard, G.-D.: Amöbenruhr und Amöbenleberabszeß. *Deutsches Ärzteblatt* 93, Heft 2, 2659 - 2665 (1996).