

RIDASCREEN® Cryptosporidium

Codice prodotto: C1201



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany

Telefono: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Campo di applicazione

Per uso diagnostico *in vitro*. RIDASCREEN® Cryptosporidium è un test immunoenzimatico per la rilevazione qualitativa di *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis* in campioni di feci umane.

2. Sintesi e spiegazione del test

La criptosporidiosi è un'infezione protozoica causata dal gene *Cryptosporidium*. Si tratta di un parassita largamente diffuso negli animali e costituisce uno dei principali germi patogeni anche negli animali domestici, in particolare nei vitelli.

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 gastrointestinali quali nausea e nevralgia, simili a quelli della giardiasi (lambliasi).

I sintomi e le conseguenze sono notevolmente più gravi per i pazienti immunocompromessi, 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 è contagiosa anche tramite contatto personale con un paziente. In passato, il metodo più spesso impiegato per la diagnosi della criptosporidiosi era la rilevazione al microscopio di oocisti nelle feci e/o l'esame al microscopio di campioni biotici dell'intestino tenue, per i quali doveva essere a disposizione personale esperto.

Il test Cryptosporidium ELISA qui descritto per la determinazione simultanea di entrambi gli agenti patogeni nei campioni di feci costituisce un'importante alternativa alla diagnosi mediante esame al microscopio. La sua sensibilità è uguale a quella di un esame al microscopio, non richiede personale specificamente addestrato in parassitologia, è semplice, può essere condotto in modo rapido e non dipende dalla presenza di organismi intatti (cisti o trofozoiti) nel campione di feci.

3. Principio del test

Il test RIDASCREEN® Cryptosporidium utilizza anticorpi specifici in un metodo a sandwich. Questi anticorpi specifici anti-*Clostridium parvum* e *Cryptosporidium hominis* sono legati alla superficie del pozzetto della piastra per microtitolazione. Una sospensione del campione di feci da esaminare e i controlli vengono introdotti nel pozzetto della piastra per microtitolazione insieme ad anticorpi anti-Cryptosporidium biotinilati (Coniugato 1) mediante pipetta a temperatura ambiente (20 – 25 °C) per l'incubazione. Dopo il lavaggio aggiungere il poli-coniugato streptavidina-perossidasi (Coniugato 2) e incubare nuovamente a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Alla presenza di anticorpi anti-Cryptosporidium in un campione, si forma un complesso a sandwich composto dagli anticorpi immobilizzati, dall'antigene di Cryptosporidium e dall'anticorpo coniugato. Un altro lavaggio rimuove il poli-coniugato streptavidina-perossidasi non legato. Nei campioni positivi, l'aggiunta di un substrato trasforma l'enzima legato da una soluzione incolore in una soluzione blu. L'aggiunta di un reagente bloccante causa una variazione

cromatica da blu a giallo. L'estinzione è proporzionale alla concentrazione di antigeni di *Cryptosporidium* presenti nel campione.

4. Reagenti forniti

I reagenti nel kit sono sufficienti per 96 determinazioni.

Plate	96	Piastra per microtitolazione, 12 strisce di micropozzetti (divisibili) in telaio di fissaggio, rivestita con anticorpi specifici agli anticorpi anti- <i>Cryptosporidium parvum</i> e <i>Cryptosporidium hominis</i> .
Diluent 1	100 ml	Tampone di diluizione del campione, soluzione salina proteica tamponata, pronta per l'uso, colorazione blu
Wash	100 ml	Tampone di lavaggio, soluzione salina tamponata al fosfato (concentrata 10 volte); contiene 0,1 % di Thimerosal
Control +	2 ml	Antigene di <i>Cryptosporidium</i> inattivato; pronto per l'uso
Control -	2 ml	Controllo negativo (tampone di diluizione dei campioni); pronto per l'uso
Conjugate 1	13 ml	Anticorpi biotina-coniugati agli antigeni specifici del <i>Cryptosporidium</i> in una soluzione proteica stabilizzata; pronti per l'uso; colorati in blu
Conjugate 2	13 ml	Poli-coniugato streptavidina-perossidasi in soluzione proteica tamponata; pronto per l'uso; colorato in arancione
Substrate	13 ml	Perossido di idrogeno/TMB; pronto per l'uso
Stop	12 ml	Reagente di bloccaggio; acido solforico 1 N; pronto per l'uso

5. Reagenti e loro conservazione

Tutti i reagenti devono essere conservati a 2 – 8 °C e possono essere utilizzati fino alla data stampata sull'etichetta. Il tampone di lavaggio diluito è conservabile per 4 settimane ad una temperatura compresa tra 2 – 8 °C. Evitare la contaminazione microbica. Dopo la data di scadenza, non può essere più fornita alcuna garanzia di qualità.

La busta in alluminio deve essere aperta con le forbici, in modo tale da non rimuovere la chiusura a clip. Le strisce di microtitolazione inutilizzate devono essere immediatamente riposte nella busta in alluminio e conservate a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C.

Evitare l'esposizione diretta alla luce del substrato incolore, per evitare la decomposizione o la colorazione blu per auto-ossidazione. Un substrato che sia diventato blu non deve essere utilizzato.

6. Reagenti aggiuntivi necessari – attrezzatura richiesta

6.1. Reagenti forniti

- Acqua distillata o deionizzata

6.2. Attrezzatura

- Provette
- Pipette monouso (Codice articolo: Z0001)
- Vortificatore (opzionale, vedere Punto 9.3.)
- Micropipetta da 50 – 100 µl e 1 ml in volume
- Cilindro graduato (1.000 ml)
- Cronometro
- Dispositivo di lavaggio per piastre per microtitolazione o pipette multicanale (300 µl)
- Fotometro per piastre per microtitolazione (450 nm e filtro di riferimento 620 – 650 nm)
- Carta filtrante (carta da laboratorio)
- Contenitore di rifiuti con soluzione di ipoclorito allo 0,5 %

7. Precauzioni per gli utilizzatori

Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.

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

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.

Per maggiori informazioni consultare la Scheda di sicurezza dei materiali (MSDS) all'indirizzo www.r-biopharm.com.

Il kit include un controllo positivo che contiene l'antigene di *Cryptosporidium* inattivato. I campioni di tossine e feci devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo e maneggiati nel rispetto delle disposizioni di sicurezza nazionali.

Il tampone di lavaggio contiene 0,1 % di Thimerosal come conservante. Questa sostanza non deve entrare in contatto con la cute o le membrane mucose.

Garantire uno smaltimento idoneo e responsabile di tutti i reagenti e i materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

Fino all'uso, conservare il materiale di test a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. Qualora il materiale non possa essere utilizzato per un test entro tre giorni, si raccomanda di conservarlo a una temperatura di -20 °C o inferiore. Evitare il ripetuto congelamento e scongelamento del campione.

I campioni di feci non devono essere raccolti in contenitori per il trasporto che contengano mezzi di trasporto come conservanti, sieri animali, ioni metallici, agenti ossidanti e detergenti, in quanto potrebbero crearsi interferenze con il test RIDASCREEN® Cryptosporidium.

Se vengono usati tamponi rettali, assicurarsi che il volume del materiale fecale sia sufficiente (circa 100 mg) per il test.

Le indagini ambientali devono includere anche campioni di feci prelevati da persone che non mostrano sintomi clinici al fine di identificare i portatori asintomatici.

9. Esecuzione del test

9.1 Informazioni generali

Tutti i reagenti e la piastra di microtitolazione **Plate** devono essere portati a temperatura ambiente (20 - 25 °C) prima dell'uso. Le strisce per microtitolazione devono essere rimosse dalla busta in alluminio solo dopo il raggiungimento della temperatura ambiente. Mescolare con cura i reagenti immediatamente prima dell'utilizzo. Dopo l'uso, le strisce di micropozzetti (inserite in buste sigillate) e i reagenti devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. Una volta usate, le strisce di micropozzetti non devono essere riutilizzate. I reagenti e le strisce per microtitolazione non devono essere utilizzati se l'imballaggio è danneggiato o i flaconi non sono ermetici.

Evitare il contatto diretto dei campioni con i componenti del kit per evitare la contaminazione incrociata.

Il test non deve essere esposto all'irradiazione solare diretta. Si raccomanda di coprire la piastra per microtitolazione o di sigillarla con una pellicola in plastica per evitare la perdita per evaporazione.

9.2. Preparazione del tampone di lavaggio

Miscelare 1 parte di concentrato di tampone di lavaggio **Wash** con 9 parti di acqua distillata. Tutti i cristalli presenti nel concentrato devono essere precedentemente riscaldati (in un bagno d'acqua a 37 °C) per scioglierli.

9.3 Preparazione dei campioni

Prendere una provetta marcata e introdurre 1 ml di tampone per diluizione dei campioni RIDASCREEN® **Diluent 1**. Utilizzare una pipetta monouso (codice articolo Z0001) per aspirare un campione di feci liquide (circa 100 µl) fino a superare di poco la seconda tacca e aggiungere

lo al tampone nella provetta per ottenere una sospensione. Per realizzare una sospensione con un campione di feci solide, introdurre una quantità equivalente (circa 5050.100 mg) con una spatola o un'ansa di inoculazione monouso.

Omogeneizzare la sospensione fecale mediante aspirazione ed espulsione tramite pipetta monouso oppure, in alternativa, miscelare in un vorticatore. Lasciare riposare la sospensione per un breve periodo affinché le particelle di feci più grandi possano depositarsi, quindi il supernatante di sospensioni di feci purificato è pronto per essere utilizzato direttamente nel test. Se la procedura viene eseguita in un sistema ELISA automatico, il supernatante non deve contenere particelle. In questo caso, è consigliabile centrifugare il campione a 2.500 G per 5 minuti.

Nota:

I campioni di feci diluiti in **Diluent | 1** possono essere testati in tutti i dosaggi RIDASCREEN® ELISA per cui viene usato **Diluent | 1**.

9.4. Prima incubazione

Dopo aver riempito un numero sufficiente di pozzetti nel telaio di fissaggio, utilizzare una pipetta per introdurre 100 µl di controllo positivo **Control | +**, controllo negativo **Control | -** o sospensione di feci. Quindi aggiungere 100 µl dell'anticorpo biotina-coniugato **Conjugate | 1** e miscelare (dando dei leggeri colpi sul bordo della piastra); successivamente incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20 – 25 °C).

9.5. Lavaggio

Un accurato lavaggio è importante per ottenere i giusti risultati e deve pertanto essere effettuato in stretta conformità con le istruzioni. Il prodotto di incubazione nei pozzetti deve essere svuotato in un contenitore per rifiuti per poi essere smaltito nel rispetto delle disposizioni locali. Quindi, tamponare la piastra su carta assorbente per rimuovere l'umidità residua. Lavare la piastra cinque volte utilizzando 300 µl di lampone di lavaggio ogni volta. Assicurarsi che i pozzetti vengano completamente svuotati stroflettendoli tamponandoli dopo ciascun lavaggio su un'area di carta assorbente ancora asciutta e inutilizzata.

Se si utilizza una lavatrice per micropiastre o un sistema ELISA completamente automatico, assicurarsi che la macchina sia correttamente regolata e, se necessario, chiedere le impostazioni al produttore. I dispositivi forniti da R-Biopharm sono già programmati con le impostazioni e i protocolli di lavoro convalidati. Per evitare di bloccare gli aghi di lavaggio, non introdurre mai sospensioni di feci che non siano prive di particelle (vedere Punto 9.3., Preparazione dei campioni). Inoltre, assicurarsi che tutto il liquido venga aspirato in ogni fase di lavaggio.

9.6. Seconda incubazione

Utilizzare una pipetta per introdurre 100 µl di poli-coniugato streptavidina-perossidasi **Conjugate | 2** nei campioni, quindi incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (20 – 25 °C).

9.7. Lavaggio

Lavare come descritto al Punto 9.5.

9.8. Terza incubazione

Iniettare nei pozzetti 100 µl di substrato **Substrate**. Quindi incubare la piastra per 15 minuti al buio a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Successivamente inserire in tutti i pozzetti 50 µl di reagente di bloccaggio **Stop** per arrestare la reazione. Dopo aver accuratamente miscelato picchiando leggermente sul lato della piastra, misurare l'estinzione a 450 nm (opzionale: 450/620 nm). Regolare il punto zero contro aria, ovvero senza la piastra per microtitolazione.

Nota:

I campioni di pazienti altamente positivi possono causare precipitati nerastri del substrato.

10. Controllo della qualità – indicazioni della scadenza dei reagenti

Per il controllo della qualità eseguire il controllo positivo e negativo ad ogni esecuzione del test, per garantire la stabilità dei reagenti e la corretta esecuzione del test. Il test è eseguito correttamente se il tasso di estinzione (O.D.) del controllo negativo è inferiore a 0,2 a 450 nm (inferiore a 0,160 a 450/620 nm) e il valore misurazione del controllo positivo è superiore a 0,8 a 450 nm o a 450/620 nm. Un valore superiore a 0,2 (0,160) per il controllo negativo può indicare un lavaggio insufficiente. La deviazione dai valori richiesti, proprio come un'opacizzazione o una colorazione blu del substrato incolore prima dell'inserimento nei pozzetti, può indicare che i reagenti sono scaduti. Se i valori stipulati non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dell'attrezzatura utilizzata (p.es. calibrazione)
- Procedura di esecuzione del test corretta
- Controllare visivamente che i componenti del kit non presentino contaminazione o perdite: non utilizzare una soluzione di substrato che sia diventata blu.

Se le condizioni continuano a non essere soddisfatte dopo la ripetizione del test, rivolgersi al produttore o al proprio distributore R-Biopharm locale.

11. Valutazione e interpretazione

11.1. Calcolo del valore limite

Per stabilire il valore limite, introdurre 0,15 unità di estinzione all'estinzione misurata per il controllo negativo.

$$\text{Valore limite} = \text{estinzione per il controllo negativo} + 0,15$$

11.2. Risultati del test

Il campione è considerato **positivo** se il tasso di estinzione supera il valore limite calcolato di più del 10 %.

Il campione viene considerato **marginale** se il tasso di estinzione è compreso tra 10 % in meno e 10 % in più rispetto al valore limite. Se l'esame ripetuto con un campione di feci fresco rientra ancora nella zona grigia, il campione viene considerato negativo.

I campioni con estinzioni più grandi del 10 % sotto il limite calcolato devono essere considerati **negativi**.

12. Limiti del metodo

Il test RIDASCREEN® Cryptosporidium può determinare la presenza di antigeni di *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis*. Non è possibile stabilire una relazione tra il livello di estinzione rilevato e l'insorgenza o la gravità della sintomatologia clinica. **I risultati ottenuti devono sempre essere interpretati nel contesto del quadro clinico.**

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

Un risultato **negativo** non esclude la possibilità di infezione da *Cryptosporidium*. Un risultato simile può essere dovuto a escrezione intermittente del parassita oppure è possibile che la quantità di antigene nel campione sia insufficiente. Qualora a livello anamnestico sussista il sospetto di infezione da *Cryptosporidium*, l'esame deve essere ripetuto con un altro campione di feci.

Un risultato **marginale** può essere dovuto a distribuzione non omogenea di parassiti nel campione di feci. In questo caso, l'esame deve essere ripetuto con una seconda sospensione dallo stesso campione o in alternativa dovrà essere richiesto un altro campione di feci.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Sensibilità analitica

Per determinare la sensibilità analitica del test RIDASCREEN® Cryptosporidium ELISA, è stata eseguita l'analisi del limite di bianco (LoB) in 270 test di Diluente 1 e del limite di rilevazione (LoD) in 90 test. I risultati di questo studio sono presentati nella Tabella 1.

Tabella 1: Risultati di sensibilità analitica del test RIDASCREEN® Cryptosporidium ELISA

	MV [OD 450/620]	Cisti /.Reazione
LoB	0,031	-
LoD	0,053	1,56 x 10 ⁴

13.2. Studio di comparazione clinico

Un'indagine clinica condotta in Gran Bretagna ha valutato il test RIDASCREEN® *Cryptosporidium* utilizzando un totale di 240 campioni di feci (studi prospettici e retrospettivi in cieco). È stato condotto un confronto con i metodi di analisi al microscopio inglesi per la *Cryptosporidia* (colorazione auramina-fenolo e Ziehl-Neelsen) nonché la differenziazione della PCR in tempo reale. I risultati di questo studio sono riepilogati nella Tabella 2.

Tab.2: Confronto del test RIDASCREEN® *Cryptosporidium* ELISA con l'analisi al microscopio e la PCR in tempo reale

		Analisi al microscopio		PCR in tempo reale [#]	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
RIDASCREEN® <i>Cryptosporidium</i>	Positivo	12	11	22	1
	Negativo	1	216	1	214

Sensibilità (IC): 92 % (64 – 100)

96 % (78 – 100)

Specificità (IC): 95 % (91 – 98)

100 % (97 – 100)

[#]Quantità di materiale insufficiente in due campioni di feci

IC: Intervallo di confidenza in %

13.3. Reattività incrociata

Diversi microrganismi patogeni del tratto intestinale sono stati esaminati con il test RIDASCREEN® *Cryptosporidium* Test e ad eccezione del *Campylobacter coli* non hanno evidenziato reattività incrociata. Questi studi sono stati condotti con batteri non diluiti o sospensioni di virus con concentrazioni di organismi per ml comprese tra 10^6 e 10^9 . I risultati di questo studio sono elencati nella Tabella 3.

Tabella 3: Reattività incrociata con microrganismi patogeni

Organismo	Origine	OD [450/620] Valore medio
Adenovirus	Supernatante di coltura cellulare	0,011
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Coltura	-0,001
<i>Arcobacter butzleri</i>	Coltura	0,012
Astrovirus	Supernatante di coltura cellulare	-0,001
<i>Bacillus cereus</i>	Coltura	0,006
<i>Bacteroides fragilis</i>	Coltura	-0,005
<i>Campylobacter coli</i>	Coltura	0,181

<i>Campylobacter jejuni</i>	Coltura	0,034
<i>Candida albicans</i>	Coltura	0,016
<i>Citrobacter freundii</i>	Coltura	0,008
<i>Clostridium difficile</i>	Coltura	0,009
<i>Clostridium perfringens</i>	Coltura	0,016
<i>Clostridium sordellii</i>	Coltura	0,003
<i>Cryptosporidium muris</i>	Coltura	2,782
<i>E. coli EPEC</i>	Coltura	0,031
<i>E. coli ETEC</i>	Coltura	0,002
<i>E. coli STEC</i>	Coltura	0,017
<i>Entamoeba histolytica</i>	Coltura	-0,003
<i>Enterobacter cloacae</i>	Coltura	0,007
<i>Enterococcus faecalis</i>	Coltura	0,001
<i>Giardia lamblia</i>	Feci	-0,004
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Coltura	0,030
<i>Proteus vulgaris</i>	Coltura	0,016
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Coltura	0,037
Rotavirus	Supernatante di coltura cellulare	0,009
<i>Salmonella enteritidis</i>	Coltura	0,018
<i>Salmonella typhimurium</i>	Coltura	0,010
<i>Serratia liquefaciens</i>	Coltura	0,005
<i>Shigella flexneri</i>	Coltura	0,013
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coltura	0,020
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Coltura	0,018
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Coltura	0,019
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Coltura	0,015

13.4. Precisione

La riproducibilità intra-test è stata valutata analizzando 40 replicati di questi riferimenti che rappresentavano la gamma di misurazione completa da negativo ad altamente positivo. Sono stati determinati i valori medi e i coefficienti di variazione (CV) per tre lotti dei kit. Per la riproducibilità inter-analisi, le misurazioni dei riferimenti sono state eseguite in 10 giorni lavorativi diversi con 2 serie al giorno con test doppi. Le misurazioni sono state eseguite con tre lotti di kit da parte di tre tecnici. La riproducibilità inter-lotto è stata determinata per tutti e tre i lotti di kit. I risultati di questo studio sono presentati nella Tabella 4. Tabella 4: Riproducibilità/precisione del test RIDASCREEN® *Cryptosporidium* ELISA

Tabella 4: Riproducibilità/precisione del test RIDASCREEN® Cryptosporidium ELISA

Riferimento		Intra-analisi			Inter-analisi			Inter-lotto
		Lotto del kit 1	Lotto del kit 2	Lotto del kit 3	Lotto del kit 1	Lotto del kit 2	Lotto del kit 3	Lotto del kit 1-3
1	MV [OD 450/620]	2,262	2,584	2,562	1,729	2,163	1,926	1,939
	VC (%)	6,00%	7,36%	4,75%	17,34%	15,94%	11,19%	18,47%
2	MV [OD 450/620]	1,391	1,636	1,508	1,000	1,275	1,158	1,144
	VC (%)	5,81%	6,94%	5,93%	14,94%	18,02%	11,26%	19,20%
3	MV [OD 450/620]	1,050	1,083	1,262	0,759	1,012	0,891	0,887
	VC (%)	8,17%	8,15%	7,67%	17,72%	18,02%	13,20%	22,23%
4	MV [OD 450/620]	0,675	0,706	0,766	0,413	0,562	0,511	0,495
	VC (%)	4,93%	7,33%	7,97%	18,15%	20,13%	13,03%	23,01%
5	MV [OD 450/620]	0,461	0,487	0,479	0,259	0,357	0,320	0,312
	VC (%)	5,60%	9,69%	7,49%	25,29%	26,51%	22,13%	29,03%
6	MV [OD 450/620]	0,228	0,287	0,268	0,148	0,214	0,194	0,185
	VC (%)	6,96%	9,71%	6,67%	26,68%	25,63%	20,87%	30,12%

13.5 Sostanze interferenti

Le sostanze incluse nell'elenco seguente non hanno mostrato effetti sui risultati dei test quando miscelate nei supernatanti di campioni di feci positivi e negativi nelle concentrazioni descritte :

solfo di bario (mezzo di contrasto radiologico, 18,5 % w/w), Loperamide (farmaco antidiarroico; 0,02 % w/w), Peptobismol (farmaco antidiarroico, 6,6 % v/w), ciclamato di sodio (edulcorante artificiale, 1,3 % v/w), sangue umano (5,0 % v/w), acido stearico / acido palmitico (grassi nelle feci, miscela 1:1, 40,0 % w/w), diclofenac (farmaco analgesico, 0,1 % v/w).

Nel caso del metronidazolo (0,5) (antibiotico, 3,0 % v/w) e delle mucine (5,0 % w/w), sono state studiate le possibili relazioni tra dose ed effetto.

L'analisi della diluizione seriale con metronidazolo non ha tuttavia mostrato una relazione tra la concentrazione e i valori OD. L'unica eccezione è la concentrazione massima testata, ma questa è addirittura superiore alla concentrazione del "caso peggiore" già testata nella prima analisi (tre volte la dose quotidiana). Di conseguenza l'interferenza dovuta al metronidazolo può esse-

re considerata improbabile. I test con le mucine hanno confermato la prima analisi, in quanto i valori OD decisamente troppo bassi e che hanno alterato le valutazioni dei campioni sono risultati ripetutamente presenti in tutte le diluizioni seriali. Le mucine vengono quindi considerate sostanze in grado di interferire.

Appendice

Simboli specifici del test:

Plate	Piastra per microtitolazione:
Diluent 1	Tampone di diluizione del campione
Wash	Tampone di lavaggio
Control +	Controllo positivo
Control -	Controllo negativo
Conjugate 1	Coniugato 1
Conjugate 2	Coniugato 2
Substrate	Substrato
Stop	Reagente di bloccaggio

Letteratura

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).