

RIDA[®] QUICK
Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi

N° art. : N1722



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



1. Domaine d'utilisation

Pour le diagnostic *in vitro*. Le RIDA®QUICK Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi Test est un test rapide immunochromatographique pour caractériser qualitativement le *Cryptosporidium parvum* et / ou *Giardia lamblia* et / ou *Entamoeba histolytica* (sensu lato) dans les échantillons de selles.

2. Résumé et explication du test

Giardia lamblia fait partie des flagellés intestinaux. Les trophozoïtes morphologiquement caractéristiques ne survivent que très brièvement en dehors de l'organisme l'hôte. La transmission se fait par les kystes très infectieux. En raison de sa propagation mondiale, *Giardia lamblia* est une cause importante des diarrhées chroniques, en particulier pour les problèmes de médecine des voyageurs. L'infection survient après l'absorption de kystes dans des denrées alimentaires contaminées et de l'eau. Au sein de collectivités avec une hygiène déficiente, l'infection survient très souvent par voie fécale de personne en personne. Cette voie de transmission survient particulièrement fréquemment dans les crèches et jardins d'enfants, ainsi que sur les hommes homosexuels et les indigènes. Les parents peuvent être infectés par leurs enfants. Contrairement aux jeunes enfants, des enfants plus âgés infectés peuvent ne pas avoir de symptômes. Pourtant, ils éliminent des kystes et peuvent infecter d'autres personnes. La giardiase (lambliaose) survient comme diarrhée aiguë ou chronique. La période d'incubation est de 3 à 42 jours. La méthode la plus utilisée dans le passé pour diagnostiquer une giardiase était la caractérisation microscopique des kystes dans les selles ; il était toutefois indispensable d'avoir du personnel expérimenté. Les examens doivent en outre être effectués sur une longue période puisque l'élimination des kystes est soumise à de fortes variations.

Le *Cryptosporidium parvum* est un parasite qui est très répandu chez les animaux et que l'on peut trouver comme germe pathogène également chez les animaux domestiques, en particulier les veaux. Toutefois, les infections de l'homme sont observées et sont plus fréquentes qu'autrefois. Le parasite entraîne souvent chez les enfants dans les pays tropicaux en voie de développement des diarrhées endémiques et épidémiques. Sur les patients immunocompétents, la maladie se manifeste comme gastro-entérite à auto-guérison. La diarrhée dure entre 3 et 14 jours et peut être accompagnée de fièvre et de symptômes gastro-intestinaux, comme les nausées et les douleurs, ressemblant à ceux de la giardiase (lambliaose). Les symptômes et les effets sont beaucoup plus sérieux sur les patients immunoincompétents sur lesquels les diarrhées sont graves et persistent. La transmission de l'infection de l'animal à l'homme par l'eau contaminée peut également s'effectuer de l'homme à l'homme. Les membres des collectivités, les enfants dans les jardins d'enfants et les groupes à risques des hommes homosexuels et les personnes infectées par le HIV sont particulièrement mis en danger. La méthode utilisée la plus couramment dans le passé pour diagnostiquer le cryptosporidiose était la justification microscopique des oocystes dans les selles ou l'examen microscopique de

prélèvements de biopsie de l'intestin grêle, ce qui entraînait la présence obligatoire d'un personnel compétent.

Dans le monde entier, **Entamoeba histolytica (sensu lato)** infecte chaque année jusqu'à 500 millions de personnes. Des études de génétique moléculaire ont montré que les protozoaires – portant la dénomination *Entamoeba histolytica* - identifiés avec les méthodes de diagnostic traditionnelles se composent de deux espaces ne pouvant pas être distingués au niveau morphologique, l'espèce pathogène *Entamoeba histolytica* au sens strict et l'espèce *Entamoeba dispar* non pathogène selon les connaissances scientifiques actuelles. Environ 90 % des infections par *Entamoeba* sont causées par l'*E. dispar*. Les 40 – 50 millions de cas annuels environ de colite amibienne ou d'abcès du foie avec 80 000 cas mortels sont causés par l'*E. histolytica*.

Le cycle vital de l'*Entamoeba* est relativement simple. L'infection s'effectue par absorption orale de kystes à quatre noyaux. Ceux-ci entraînent la formation dans l'intestin grêle de la forme végétative à un noyau du parasite, le trophozoïte (forme minuta) qui se multiplie et différencie principalement dans le côlon. Ces trophozoïtes s'enkystent vraisemblablement en raison du milieu dans la zone inférieure du côlon. Les trophozoïtes ne seront trouvés dans les selles en plus des kystes qu'en cas de passage accéléré de l'intestin.

Les symptômes cliniques d'une amibiase sont déclenchés par l'invasion du parasite allant du lumen dans la muqueuse du côlon. On trouve alors souvent des trophozoïtes avec des érythrocytes phagocytés. Ces trophozoïtes sont désignés sous la forme magna en raison de leur dimension. Les conséquences de l'invasion dans la muqueuse intestinale sont la diarrhée, la dysenterie et même les amoebomes. Après une diffusion disséminée, des abcès du foie, des poumons ou dans certains cas très rares des abcès du cerveau peuvent survenir comme complication ; ces maladies devenant mortelles si elles ne sont pas traitées.

Les symptômes cliniques de la forme intestinale aiguë de l'amibiase sont des douleurs abdominales spasmodiques accompagnées de nausées et de fortes diarrhées avec des selles contenant des glaires sanglantes. La phase aiguë peut se transformer en une phase chronique avec des diarrhées occasionnelles alternant avec de la constipation, des douleurs abdominales, des nausées et des vomissements. On a également décrit des excréteurs de kystes n'entraînant vraiment aucun symptôme.

Dans env. 10 % des cas d'une dysenterie amibienne aiguë, des complications extra-intestinales surviennent, comme des abcès du foie ou l'affection d'autres organes. En cas d'amibiase extra-intestinale, une caractérisation sérologique des anticorps est indiquée.

Le diagnostic de l'amibiase intestinale peut être fourni au moyen de procédés microscopiques coûteux à travers la caractérisation des kystes et des trophozoïtes dans les selles. Puisque l'épaisseur des parasites peut être très faible, on suppose que la sensibilité de cette méthode n'est que de 75 % avec un examen unique des selles réalisé par des personnes expérimentées. En outre, on risque de confondre l'*Entamoeba* avec les cellules d'un dermatophyte, avec des granulocytes, des macrophages et des champignons.

Les procédés de test immunologiques sensitifs avec des anticorps spécifiques contre les antigènes d'Entamoeba, sont nettement plus avantageux. En effet, le diagnostic est indépendant d'un jugement subjectif et est plus sensible en raison de la saisie des composants ne pouvant plus être identifiés sur le plan morphologique. Seule la forme invasive de l'Entamoeba provoque une formation d'anticorps. Puisque le titrage des anticorps peut être caractérisé la plupart du temps en même temps que le début des symptômes cliniques, il est possible d'utiliser également pour identifier l'E. histolyca une caractérisation des anticorps spécifiques. Celle-ci offre de plus la possibilité via le niveau du titrage d'effectuer une distinction entre une amibiase intestinale et une amibiase extra-intestinale, ce qui est important pour le choix de la thérapie.

Une autre méthode importante par rapport à la microscopie, pour caractériser le Cryptosporidium parvum et la Giardia lamblia, est le test rapide immunochromatographique décrit ci-dessous, dont la sensibilité et la spécificité ont la même valeur que le procédé d'examen microscopique grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux. La réalisation est simple et rapide et aucun personnel spécialement formé à la microbiologie n'est requis.

3. Principe du test

Le présent test rapide est un test à débit latéral immunochromatographique à un niveau, dans lequel les anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes des parasites sont couplés à des particules de latex vertes (spécifiques à l'Entamoeba), rouges (spécifiques au Giardia) ou bleues (spécifiques au Cryptosporidium). D'autres anticorps spécifiques contre les trois agents pathogènes sont liés de manière fixe à la membrane. Dans un premier temps, l'échantillon de selles est mis en suspension dans le tampon d'extraction puis est mis en sédimentation. Les bandes de test sont plongées dans le liquide clair du dessus du prélèvement, celui-ci passant à travers la membrane avec les particules colorées de latex, sur lesquelles – dans un cas positif – l'antigène présent se lit, et se liant à la bande collectrice spécifique. En fonction de l'antigène présent dans l'échantillon, une bande verte, et/ou rouge et/ou bleue est visible.

4. Contenu de l'emballage

Les réactifs d'un emballage suffisent à 25 déterminations.

Strip	25 déterm.	Tube avec 25 bandes de test
Diluent	26 ml	Tampon d'extraction, prêt à l'emploi : contient 0,1 % d'azide de sodium
Pipet	25 pcs	Sachet avec 25 pipettes à usage unique

5. Les réactifs et leur stockage

Le paquet peut être entreposé à 2 – 30° C et peut être utilisé jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Lorsque la date de péremption est atteinte, aucune garantie de qualité ne peut plus être acceptée. Le tube avec les bandes de test contient un produit siccatif et ne doit pas être laissé ouvert pour éviter toute humidité. Il doit être refermé après chaque prélèvement de bandes de test.

6. Réactifs supplémentaires nécessaires – Accessoires requis

- Tubes à essai pour suspension de selles
- Tubes (en option : puits de microtitration non revêtus) pour le liquide du dessus de la suspension
- Mélangeur Vortex (en option :
- Micropipette (200 µl – 1000 µl)
- Poubelle avec une solution d'hypochlorite au sodium à 0,5 %

7. Mesures de précaution

Uniquement pour le diagnostic *in vitro*.

Ce test ne doit être effectué que par un personnel de laboratoire formé. Les directives concernant le travail dans des laboratoires médicaux doivent être respectées. La notice d'utilisation de réalisation du test doit être respectée rigoureusement.

Le tampon de dilution des échantillons contient de l'azide de sodium comme agent conservateur. Tout contact avec la peau ou les muqueuses doit être évité.

Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs avec la bouche, éviter tout contact sur des lésions de la peau ou sur des muqueuses. Au cours du maniement avec les échantillons, porter des gants à usage unique et à l'issue du test, se laver les mains. Ne pas fumer, manger ou boire dans les locaux dans lesquels les échantillons sont manipulés.

Tous les réactifs et les matériaux, pouvant entrer en contact avec des échantillons potentiellement infectieux, doivent être traités comme ces derniers avec des désinfectants adéquats (par ex. hypochlorite de sodium) ou être passés à l'autoclave au minimum pendant une heure à 121° C.

8. Accumulation et stockage des échantillons

Les échantillons de selles doivent être collectés dans des récipients propres sans un quelconque additif et doivent être stockés à 2 – 8° C avant le début du test. En cas de stockage

de plus de 3 jours, l'échantillon doit être surgelé à -20° C. Dans ce cas, l'échantillon est entièrement décongelé avant le début du test et est amené à température ambiante. Il faut éviter de congeler et de décongeler plusieurs fois l'échantillon.

Lorsqu'il est nécessaire d'utiliser des frottis rectaux, il faut veiller à disposer d'une quantité nécessaire de selles pour effectuer le test (env. 50 mg).

9. Réalisation du test

9.1. Généralités

Avant d'utiliser le test, les échantillons, le tampon d'extraction et les bandes de test doivent être amenés à température ambiante ($20 - 25^{\circ}$ C). Lorsque la température ambiante est atteinte, le tube avec les bandes de test doit être ouvert puis être refermé une fois que les bandes de test nécessaires ont été prélevées. Les barrettes de test utilisées ne doivent pas être réutilisées. Tout rayonnement direct du soleil au cours de la réalisation du test doit être évité.

Le réactif excédentaire ne doit pas être reversé dans le récipient puisque cela pourrait entraîner une contamination.

9.2. Préparation des échantillons

On verse dans un tube à essai marqué 1 ml de tampon d'extraction **Diluent**. Dans le cas d'un échantillon de selles **liquides**, 100 μ l sont mis en suspension avec la pipette à usage unique dans le tampon préparé (s'arrêter juste au-dessus du deuxième gonflement). En cas d'échantillons de selles **solides**, 50 mg sont mis en suspension dans le tampon. L'échantillon doit ensuite être bien homogénéisé. Il est nécessaire pour ce faire d'aspirer plusieurs fois et d'expulser la suspension avec la pipette à usage unique **Pipet** ou de la mélanger avec un mélangeur Vortex. Il est ensuite nécessaire de laisser sédimenter la suspension homogène pendant **3 minutes** au minimum jusqu'à ce qu'un liquide clair se forme au-dessus ; **200 μ l** à **500 μ l** au maximum de ce liquide sont ensuite transvasés dans un autre tube propre (ou puits de microtitration non revêtu).

9.3. Test du prélèvement

La bande de test **Strip** est retirée du tube et est plongée dans le prélèvement préparé. Elle ne doit pas alors dépasser la ligne marquée d'une flèche. Au bout de **10 minutes**, le résultat du test peut être lu.

10. Contrôle de qualité – Signes d'une dénaturation du réactif

Ce test ne peut être exploité que lorsque la bande de test est intacte **avant** d'être mise dans la suspension réalisée du prélèvement et lorsqu'elle ne présente aucune altération de couleur ou

aucune bande de couleur. De plus, à l'issue de l'incubation test, la bande de contrôle **rouge pourpre** doit être au minimum visible. Si celle-ci n'apparaît pas, il convient de contrôler les éléments suivants avant de renouveler le test:

- Conservation des bandes de test et du tampon d'extraction utilisé
- Réalisation correcte du test
- Contamination du tampon d'extraction

Lors du renouvellement du test avec une nouvelle bande de test, si la bande de contrôle n'est toujours pas visible, il faut vous adresser au fabricant ou à votre distributeur local R-Biopharm.

11. Analyse et interprétation

Au maximum quatre bandes peuvent apparaître, en étant aperçues de l'endroit de prélèvement de l'échantillon et dans l'ordre suivant : une bande (de contrôle) bleue, une rouge, une verte et une rouge pourpre **Si la bande de contrôle rouge pourpre manque, le test ne peut pas être analysé et n'est plus valable!**

Les interprétations suivantes sont possibles:

- **Cryptosporidium positif** : les bandes **bleu** et **rouge pourpre** sont visibles.
- **Giardia positif** : les bandes **rouge** et **rouge pourpre** sont visibles.
- **Entamoeba positif** : **les bandes verte et rouge pourpre sont visibles.**
- De plus, toutes les combinaisons des trois bandes de test spécifiques peuvent survenir avec la bande de contrôle rouge pourpre, en fonction de la présence des trois agents pathogènes dans l'échantillon.
- **Négatif** : Seule **la bande de contrôle rouge pourpre** est visible.
- **Non valable** : aucune bande n'est visible ou une autre constellation que celle décrite ci-dessus et d'autres altérations de couleurs des bandes sont présentes. De plus, les colorations des bandes, survenant au bout de 10 minutes ou ultérieurement, n'influent pas sur le diagnostic et ne doivent pas être analysées.

12. Limites de la méthode

Le RIDA[®]QUICK Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi caractérise l'antigène du Cryptosporidium parvum et/ou Giardia lamblia et/ou Entamoeba histolytica (sensu lato) dans les échantillons de selle. Il n'est pas possible d'en déduire un rapport entre l'intensité des bandes spécifiques visibles et l'apparition ou la gravité des symptômes cliniques. **Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés en liaison avec le tableau clinique.**

Un résultat **positif** n'exclut pas la présence d'autres agents pathogènes infectieux.

Un résultat **négatif** n'exclut pas une éventuelle infection due à un *Cryptosporidium* ou un *Lamblia* ou un *Entamoeba*. Il peut être causé par l'élimination intermittente de l'agent pathogène ou par une quantité trop faible d'antigène dans l'échantillon. Si, sur le plan de l'anamnèse, une infection avec l'agent pathogène recherché est soupçonnée avec raison, un autre prélèvement de selles du patient doit être examiné.

Un excédent de prélèvement de selles peut entraîner des bandes de couleur marron à la place des bandes colorées spécifiquement. Ces bandes marrons n'influent pas sur le diagnostic. Dans de tels cas, un autre test est nécessaire en utilisant une quantité de selles plus faible ou une nouvelle dilution de la suspension déjà réalisée (liquide clair au-dessus après la sédimentation) afin de déterminer si les agents pathogènes recherchés se trouvent vraiment dans le prélèvement et ont été recouverts par une quantité trop élevée de matrice utilisée de

13. Caractéristiques

13.1. Etudes comparatives cliniques

Dans une étude de plusieurs centres avec 5 institutions différentes, 252 échantillons de selles au total, ayant été prédéfinis avec différentes méthodes et conservés en étant congelés, ont été étudiés après décongélation dans le test rapide Combi RIDA[®]QUICK *Cryptosporidium*/*Giardia*/*Entamoeba* Combi. Les différents résultats sont réunis dans le tableau 1 et la sensibilité comme la spécificité moyenne des différents résultats des 5 instituts de validation ont été calculées.

Tab.1 Regroupement des résultats d'une étude de plusieurs centres avec le test rapide Combi RIDA[®]QUICK *Cryptosporidium*/*Giardia*/*Entamoeba* Combi

Méthode de référence	Echantillon				Bande test spécifique pour parasites					
	total	pos.	négatif		Cryptosporidium		Giardia		Entamoeba	
			aucun parasites	autres	Sens.	Spéc.	Sens.	Spéc.	Sens.	Spéc.
Microscopie	28	28	0	0	87,5	-	80	-	60	-
Microscopie	63	32	20	11	100	100	100	100	-	100
Microscopie	32	12	15	5	-	-	88,9	100	100	80
Microscopie / 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
Somme	252	170	57	25	83,0 %	93,3%	91,9%	99,5%	84,8%	87,4%

13.2. Réactivité croisée

Aucun des parasites intestinaux énumérés ci-après n'entraîne de réaction croisée dans le 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. 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).
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).