

RIDA[®] QUICK
Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi

Art. n.º: N1722



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. Área de utilização

Para diagnóstico *in vitro*. O RIDA[®]QUICK Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi Test é um teste rápido imunocromatográfico para a comprovação qualitativa de *Cryptosporidium parvum* e / ou *Giardia lamblia* e / ou *Entamoeba histolytica* (sensu lato) em 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 diarreicas, 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 do 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 o 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.

Anualmente, até 500 milhões de pessoas são infeccionadas com **Entamoeba histolytica (sensu lato)** em todo o mundo. Os exames moleculares-genéticos demonstraram que os protozoários denominados Entamoeba histolytica, identificados com os métodos comuns, são formados de duas espécies não diferenciáveis morfologicamente, a espécie patogénica Entamoeba histolytica sensu stricto e a espécie Entamoeba dispar, considerada apatogénica de acordo com o conhecimento actual. Supostamente, 90 % das infecções com Entamoeba são causadas por E. dispar. Os casos anuais de aproximadamente 40 - 50 milhões de colite amebiana ou abscesso do fígado com 80.000 de casos mortais são causados por E. histolytica. O ciclo vital da Entamoeba é relativamente fácil. A infecção ocorre através da ingestão oral de cistos com 4 núcleos. Destes cistos, desenvolve-se no intestino delgado a forma vegetativa mononuclear do parasita, o trofozoide (forma minuta), que se multiplica e se diferencia principalmente no intestino grosso. Provavelmente, o encistamento inicia através do ambiente na área inferior do intestino grosso. Os trofozoides encontram-se ao lado dos cistos nas amostras somente com passagem rápida no intestino.

Os sintomas clássicos de uma amebiase são iniciados através da invasão do parasita a partir do lúmen do intestino na mucosa do cólon. Deste modo, encontra-se frequentemente trofozoides com eritrócitos fagocitados. Estes trofozoides são denominados como forma Magna devido à sua dimensão. As consequências da invasão na mucosa intestinal são diarreia, desinteria ou mesmo a amebiase. Como complicação, após a distribuição disseminada podem originar-se abscessos no fígado, abscessos no pulmão ou, em casos muito raros, abscessos no cérebro, que se não tratados, podem levar à morte.

Os sintomas clínicos das formas intestinais agudas da amebiase são dores abdominais em forma de câibras com náusea e forte diarreia, com sangue e mucosas nas fezes. O estado agudo pode passar a um estado crónico com diarreia ocasional, alternada com obstipação, dores abdominais, náusea e vómitos. Foram descritos também portadores de cistos totalmente assintomáticos.

Em aproximadamente 10 % dos casos de uma desinteria amebiana aguda, ocorrem complicações extra-intestinais, como abscessos do fígado ou ataque a outros órgãos. No caso de amebiase extra-intestinal, é demonstrada uma detecção sorológica dos anticorpos.

O diagnóstico da amebiase intestinal pode ser feito através de um trabalhoso processo microscópico com a detecção de cistos e trofozoides nas fezes. Visto que a densidade de parasitas pode ser muito baixa, suponha-se que a sensibilidade deste método com um único exame de fezes, mesmo com pessoal experiente, é de somente 75 %. Além disso, há o risco de equívoco da Entamoeba com células do epitélio intestinal, cistos granuloma, macrófagos e fungos.

Uma grande vantagem neste caso oferecem os processos de teste imunológicos com anticorpos específicos contra antígenos de Entamoeba. Para isso, o diagnóstico não depende de uma opinião subjectiva e é mais sensível através da detecção também de componentes morfologicamente não mais identificáveis. Somente a forma invasiva da Entamoeba provoca a formação de anticorpos. Visto que os títulos de anticorpos são detectáveis com o começo dos

sintomas clínicos, para a identificação de *E. histolytica* pode-se fazer também a detecção de anticorpos específicos. Isto oferece, além disso, a possibilidade de diferenciar a quantidade do título entre amebiose intestinal e extra-intestinal, o que é decisivo para a selecção da terapia.

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 de nível único, no qual anticorpos específicos dispostos contra os anti-genes dos parasitas são acoplados a partículas de látex verdes (específicas para *Entamoeba*), vermelhas (específicas para *Giardia*) ou azuis (específicas para *Cryptosporidium*). Outros anticorpos específicos contra os três agentes patogénicos são ligados firmes na membrana. Depois a amostra de fezes é suspensa no tampão de extracção e então sedimentada. A tira do teste é mergulhada no supernatante claro da amostra, 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 verde, e/ou vermelha e/ou azul.

4. Conteúdo da embalagem

Os reagentes de uma embalagem são suficientes para 25 doses

Strip	25 doses	Tubos com 25 tiras de teste
Diluyente	26 ml	Tampão de extracção, pronto para o uso; contém 0,1 % azida de sódio
Pipet	25 unidades	Saco com 25 pipetas descartáveis

5. Reagentes e 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. O tubo com as tiras do teste contém um desidratante e não deve ser deixado aberto para evitar a humidade. Após cada retirada de tiras do teste a embalagem deve ser cuidadosamente fechada.

6. Reagentes adicionais necessários – equipamento necessário

- Tubo de amostra para suspensão de fezes
- Tubo (opcional: frascos microtítulo não revestidos) para supernatante e suspensão
- 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

Apenas para o diagnóstico *in vitro*.

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

O tampão de diluição de amostra contém azida de sódio como conservante. Deve-se evitar o contacto com a pele ou as mucosas.

Não pipetar as amostras ou reagentes com a boca, evitar o contacto com a pele ferida ou mucosas. Durante o manuseamento 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) ou autoclavados pelo menos 1 hora a 121 °C.

8. Recolha e armazenamento 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 o congelamento e descongelamento repetido das amostras.

Se forem utilizadas recolhas anais, 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 extracção e a tira do teste devem ser colocados em temperatura ambiente (20 – 25 °C). O tubo com as tiras do teste deve ser aberto só após a temperatura ambiente ter sido alcançada e deve ser fechado após a retirada das tiras de teste necessárias. As tiras do teste não podem ser usadas mais de uma vez. A luz do sol directa 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, colocado 1 ml de tampão de extracção **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 homogeneizada. 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. Após isso, deixar sedimentar a suspensão homogénea pelo menos por **3 minutos** até que um supernatante claro se forme, do qual então pelo menos **200 µl** até um mínimo de **500 µl** é passado para um outro tubo limpo (ou frasco microtítulo não revestido).

9.3. Teste das amostras

A tira de teste **Strip** é retirada do tubo e mergulhada na amostra preparada. A tira de teste deve ser mergulhada apenas até à linha marcada com uma seta. Após **10 minutos** o resultado do teste pode ser lido.

10. Controlo de qualidade – Sinais de expiração do reagente

O teste só deve ser avaliado se a tira de teste estiver intacta **antes** da colocação na suspensão de amostras produzida e não se pode ver modificações ou tiras coloridas. Além disso, **após** a

incubação do teste, pelo menos a tira de controlo **púrpura** deve ser visível. Se ela não aparece, antes de repetir o teste deve-se verificar o seguinte:

- Durabilidade das tiras de teste e do tampão de extracção utilizado
- Execução correcta do teste
- Contaminação do tampão de extracção

Se após a repetição do teste com uma nova tira de teste a tira de controlo não for visível, entre em contacto com o fabricante ou com o seu distribuidor local R-Biopharm.

11. Avaliação e interpretação

Só podem aparecer quatro tiras no máximo, vistas da posição de colocação da amostra na seguinte sequência: uma tira de reacção azul, uma vermelha, uma verde e uma púrpura (tiras de controlo). **Se faltar a tira de controlo púrpura, o teste não é avaliável e é inválido !**

As seguintes interpretações são positivas:

- **Cryptosporida positivas** : as tiras **azul** e **púrpura** são visíveis.
- **Giardia positiva** : as tiras **vermelha** e **púrpura** são visíveis.
- **Entamoeba positiva** : as tiras **verde** e **púrpura** são visíveis.
- Além disso podem ocorrer todas as combinações das três tiras de teste específicos com a banda de controlo púrpura, conforme a existência dos três agentes patogénicos na amostra.
- **Negativo**: apenas a **tira de controlo púrpura** 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 dos métodos

O RIDA[®]QUICK Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi comprova antígenos de Cryptosporidium parvum e / ou Giardia lamblia e / ou Entamoeba histolytica (sensu lato) 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 patogénicos infecciosos.

Um resultado **negativo** não exclui uma possível infecção com Cryptosporidium, Lamblia ou Entamoeba. Ele pode ter sido causado pela segregação do agente patogénico ou por uma quantidade muito pequena de antígeno na amostra. Se houver de forma anamnésica a

suspeita fundada de uma infecção com o agente patogénico 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 patogénico 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 estudo "multicentralizado" com 5 diferentes instituições, foram conservadas e congeladas com diferentes métodos pré-determinados, 252 amostras de fezes, que foram analisadas após o descongelamento na combinação de teste rápido RIDA®QUICK Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi. Os resultados individuais estão compiladas na Tabela 1 e a sensibilidade e especificação médias dos resultados individuais dos 5 locais de validação foram calculadas.

Tab.1 Resumo dos resultados de um estudo multicentralizado com o RIDA®QUICK Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi teste rápido combinado

Método de referência	Amostras				Banda de Teste Específica de Parasitas					
	Total	Pos.	Negativo		Cryptosporidium		Giardia		Entamoeba	
			Ne-nhu-ma	Outros	Sens.	Esp.	Sens.	Esp.	Sens.	Esp.
Microscopia	28	28	0	0	87,5	-	80	-	60	-
Microscopia	63	32	20	11	100	100	100	100	-	100
Microscopia	32	12	15	5	-	-	88,9	100	100	80
Microscopia / 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
Soma	252	170	57	25	83,0 %	93,3%	91,9%	99,5%	84,8%	87,4%

13.2. Actividade cruzada

Nenhum dos parasitas intestinais descritos abaixo levaram a uma reacção cruzada em 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

Bibliografia

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).