

RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi

Réf. : C1121



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



1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro*. Le test RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi est un dosage immunoenzymatique destiné à l'identification qualitative de *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis*, et/ou de *Giardia lamblia* dans des échantillons de selles humaines.

2. Résumé et explication du test

L'espèce *Giardia lamblia* est un parasite flagellé qui provoque des infections dans l'intestin grêle des humains après une ingestion par voie orale de cet organisme sous forme de kystes. Du fait de sa répartition dans le monde entier, l'agent pathogène *Giardia lamblia* est une cause importante de diarrhée chronique, en particulier dans les cas médicaux liés aux voyages. L'infection survient après ingestion des kystes dans des aliments ou de l'eau contaminés. Aux États-Unis, l'agent pathogène *Giardia lamblia* est la cause la plus fréquente de maladies à diarrhée en rapport avec l'ingestion d'eau. Dans les pays en développement, l'infection à *Giardia* est l'une des plus fréquentes causes de maladie chez les enfants de moins de dix ans, avec une prévalence de 15 à 20 %. La giardiase (lambliaose) survient sous forme de diarrhée aiguë ou chronique ; les personnes asymptomatiques peuvent aussi excréter des kystes du parasite. La durée de la période d'incubation est de 3 à 42 jours.

L'infection aiguë se traduit par les symptômes suivants : survenue soudaine de diarrhée liquide (selles fréquentes de couleur jaune, de consistance mousseuse et malodorantes, accompagnées de flatulences), perte d'appétit, nausée, léthargie et perte de poids.

La méthode la plus utilisée dans le passé pour diagnostiquer la lambliaose consistait à examiner au microscope des échantillons de selles pour détecter les kystes. Cette méthode nécessite la présence obligatoire d'un personnel compétent. Il est aussi nécessaire de réaliser ces tests en suivant une séquence de nombreux échantillons de selles pendant une période prolongée, car la fréquence d'excrétion des kystes est très variable.

La cryptosporidiose est une infection protozoaire qui est causée par le genre *Cryptosporidium*. Il s'agit d'un parasite qui est très répandu chez les animaux et que l'on peut trouver comme micro-organisme pathogène chez les animaux domestiques, en particulier les veaux.

Chez les patients immunocompétents, la maladie se manifeste comme une gastro-entérite à guérison spontanée. La diarrhée dure de 3 à 10 jours et peut être accompagnée de fièvre et de symptômes gastro-intestinaux, comme des nausées et des douleurs ressemblant à celles de la giardiase (lambliaose).

Les symptômes et les effets sont beaucoup plus graves chez les patients immunodéprimés chez qui les diarrhées sont très graves et persistantes. L'infection peut être transmise de l'animal à l'homme par l'eau contaminée, mais aussi de l'homme à l'homme lors d'un contact direct avec un patient. La méthode utilisée le plus couramment dans le passé pour diagnostiquer la cryptosporidiose était la détermination microscopique des ookystes dans les selles et/ou

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

Le test Cryptosporidium/Giardia Combi ELISA décrit ici représente une alternative importante à la microscopie et permet l'examen simultané de ces deux agents pathogènes dans les échantillons de selles. Sa sensibilité est tout aussi satisfaisante que celle de l'examen microscopique ; le test ne requiert pas de personnel particulier formé en parasitologie, est simple et rapide à effectuer et ne dépend pas de la présence d'organismes intacts (kystes ou trophozoïtes) dans l'échantillon de selles.

3. Principe du test

Le test RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi utilise des anticorps monoclonaux spécifiques en appliquant une méthode de type sandwich. La surface des puits de la microplaque est revêtue d'anticorps spécifiques aux antigènes des deux espèces pathogènes Cryptosporidium et Giardia. Une suspension de l'échantillon de selles à examiner ainsi que des contrôles sont pipetés ensemble avec des anticorps anti-Cryptosporidium et anti-Giardia biotinylés (conjugué 1) dans le puits de la microplaque, puis sont mis à incuber à température ambiante (20 à 25 °C). Après une étape de lavage, le conjugué polyperoxydase-streptavidine (conjugué 2) est ajouté et de nouveau mis à incuber à température ambiante (20 à 25 °C). Si des antigènes de Cryptosporidium et/ou de Giardia sont présents dans l'échantillon de selles, les anticorps immobilisés, l'antigène de Cryptosporidium et/ou de Giardia et l'anticorps conjugué forment un complexe sandwich. Le conjugué polyperoxydase-streptavidine non lié est éliminé au cours d'une autre étape de lavage. Dans les échantillons positifs, l'ajout d'un substrat modifie l'enzyme liée dans la solution incolore qui vire au bleu. L'ajout d'un réactif d'arrêt fait virer la couleur du bleu au jaune. L'extinction est proportionnelle à la concentration des antigènes de Cryptosporidium et/ou de Giardia présents dans l'échantillon.

4. Réactifs fournis

Les réactifs fournis dans la trousse permettent de faire 96 déterminations.

Plate	96	Microplaque, 12 barrettes à micropuits (sécables) sur le support, revêtue d'anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement les antigènes de <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Cryptosporidium hominis</i> et de <i>Giardia lamblia</i> .
Diluent 1	100 ml	Tampon de dilution d'échantillon, solution de NaCl tamponnée à la protéine, prêt à l'emploi, de couleur bleue.
Wash	100 ml	Tampon de lavage, solution de NaCl tamponnée au phosphate (concentrée 10 fois), contient 0,1 % de thimérosal.

Control +	2 ml	Antigène de Cryptosporidium et de Giardia inactivé, prêt à l'emploi.
Control -	2 ml	Contrôle négatif (tampon de dilution d'échantillon), prêt à l'emploi.
Conjugate 1	13 ml	Anticorps conjugués à la biotine ciblant les antigènes de Cryptosporidium et de Giardia dans une solution protéique stabilisée, prêts à l'emploi, de couleur rouge.
Conjugate 2	13 ml	Conjugué polyperoxydase-streptavidine dans une solution protéique stabilisée, prêt à l'emploi, de couleur orange.
Substrate	13 ml	Peroxyde d'hydrogène/TMB, prêt à l'emploi.
Stop	12 ml	Réactif d'arrêt, acide sulfurique 1 N, prêt à l'emploi.

5. Les réactifs et leur stockage

Tous les réactifs doivent être entreposés entre 2 et 8 °C et peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Le tampon de lavage dilué doit être conservé entre 2 et 8 °C pendant 4 semaines maximum. La contamination microbienne doit être évitée. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.

Le sachet en aluminium doit être ouvert à l'aide de ciseaux sans déchirer le joint d'étanchéité. Les barrettes à micropuits qui ne sont pas nécessaires doivent être remises immédiatement dans le sachet en aluminium et conservées entre 2 et 8 °C.

Le substrat incolore doit également être protégé de la lumière directe pour éviter qu'il ne se décompose ou ne bleuisse sous l'effet d'une auto-oxydation. Lorsque le substrat est bleu, il ne doit pas être utilisé.

6. Autres réactifs et matériels nécessaires

6.1. Réactifs fournis

- Eau distillée ou désionisée

6.2. Équipement

- Tubes à essai
- Pipettes à usage unique (réf. : Z0001)
- Agitateur-mélangeur vortex (facultatif, voir rubrique 9.3.)
- Micropipette pour volumes de 50 à 100 µl et 1 ml
- Éprouvette graduée (1 000 ml)
- Chronomètre
- Appareil de lavage pour microplaques ou pipettes multicanaux (300 µl)
- Photomètre pour microplaques (450 nm et filtre de référence à 620-650 nm)

- Papier filtre (serviettes de laboratoire)
- Conteneur de déchets avec 0,5 % de solution d'hypochlorite

7. Précautions à prendre par l'utilisateur

Uniquement pour le diagnostic *in vitro*.

Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Les instructions d'exécution du test doivent être respectées à la lettre.

Les échantillons ou réactifs ne doivent pas être pipetés à la bouche et tout contact avec une peau ou des membranes muqueuses lésées doit être évité. Lors de la manipulation des échantillons, porter un équipement de protection individuelle (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons sont manipulés.

Pour en savoir plus, consulter la Fiche de données de sécurité (FDS) à l'adresse www.r-biopharm.com.

La trousse comprend un contrôle positif qui contient l'antigène inactivé de *Cryptosporidium* et de *Giardia*. Ce contrôle doit être traité comme du matériel potentiellement infectieux et manipulé conformément aux règlements de sécurité nationaux, de la même manière que les échantillons de patients.

Le tampon de lavage contient du thimérosal à 0,1 % en tant que conservateur. Cette substance ne doit pas entrer en contact avec la peau ou les membranes muqueuses.

Après utilisation, veiller à mettre au rebut tous les réactifs et matériels d'une manière adéquate et responsable. Pour la mise au rebut, respecter les règlements nationaux.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

Avant utilisation, entreposer le matériel de test entre 2 et 8 °C. S'il n'est pas possible d'effectuer le test en l'espace de trois jours, il est préconisé de conserver le matériel à une température inférieure ou égale à -20 °C. Éviter de congeler et décongeler les échantillons plusieurs fois.

Les échantillons de selles et les frottis rectaux ne doivent pas être recueillis dans des conteneurs de transport renfermant un milieu de transport et des conservateurs, du sérum animal, des ions métalliques, des agents oxydants ou des détergents, car ces substances peuvent interférer avec le test RIDASCREEN® *Cryptosporidium*/*Giardia* Combi.

Lorsque des frottis rectaux sont utilisés, il faut veiller à disposer d'une quantité nécessaire de selles pour effectuer le test (env. 100 mg).

La recherche des contacts doit inclure des échantillons de selles provenant des personnes ayant été en contact qui ne présentent pas de symptômes cliniques, afin d'identifier des porteurs asymptomatiques.

9. Procédures de test

9.1. Informations générales

Tous les réactifs et la microplaque **Plate** doivent être ramenés à température ambiante (20 à 25 °C) avant utilisation. Les barrettes à micropuits ne doivent pas être retirées du sachet en aluminium avant d'avoir atteint la température ambiante. Les réactifs doivent être bien mélangés immédiatement avant leur utilisation. Après utilisation, les barrettes à micropuits (placées dans des sachets fermés hermétiquement) et les réactifs doivent être conservés entre 2 et 8 °C. Une fois utilisées, les barrettes à micropuits ne doivent pas être réutilisées. Les réactifs et les barrettes à micropuits ne doivent pas être utilisés si l'emballage est endommagé ou si les flacons fuient.

Pour éviter toute contamination croisée, les échantillons ne doivent pas entrer en contact direct avec les composants de la trousse.

Le test ne doit pas être réalisé à la lumière directe du soleil. Nous recommandons de couvrir la microplaque ou de placer un film plastique dessus pour éviter toute perte par évaporation.

9.2. Préparation du tampon de lavage

Mélanger 1 volume de concentré de tampon de lavage **Wash** avec 9 volumes d'eau distillée. Les cristaux éventuellement présents dans le concentré doivent être dissouts au préalable, en les réchauffant dans un bain d'eau à 37 °C.

9.3 Préparation des échantillons

Remplir un tube à essai marqué avec 1 ml de tampon de dilution des échantillons RIDASCREEN® **Diluent | 1**. Aspirer un échantillon de selles liquides (environ 100 µl) au moyen d'une pipette à usage unique (réf. Z0001) jusqu'au-dessus du deuxième repère et ajouter au tampon du tube à essai pour obtenir une suspension.

Pour obtenir une suspension avec des selles dures, ajouter une quantité équivalente de selles (environ 50 à 100 mg) de l'échantillon, prélevée à l'aide d'une spatule ou d'une anse de prélèvement à usage unique.

Homogénéiser la suspension de selles par aspiration, puis éjection avec une pipette à usage unique ou par mélange dans un agitateur-mélangeur vortex. Laisser la suspension reposer pendant une courte période (10 minutes) pour laisser aux particules grossières de selles le temps de se déposer ; le liquide clair surnageant la suspension de selles peut être directement utilisé pour le test. Si la procédure de test est effectuée dans un automate ELISA, ce liquide surnageant doit être dépourvu de particules. Dans ce cas, une centrifugation à 2 500 G pendant 5 minutes est recommandée.

Remarque :

Des échantillons de selles dilués dans le **Diluent | 1** peuvent être soumis à tous les tests RIDASCREEN® ELISA qui utilisent le **Diluent | 1**.

9.4. Première incubation

Après avoir rempli une quantité suffisante de puits dans le support, ajouter 100 µl du contrôle positif [Control | +], du contrôle négatif [Control | -] ou de la suspension de l'échantillon de selles dans les puits. Ajouter ensuite 100 µl de l'anticorps conjugué à la biotine [Conjugate | 1] et mélanger (en tapotant légèrement le bord de la plaque), puis incuber pendant 60 minutes à température ambiante (20 à 25 °C).

9.5. Lavage

Un lavage soigneux est important afin d'obtenir des résultats corrects ; il convient donc de suivre les instructions fournies à la lettre. La substance incubée dans les puits doit être déversée dans un conteneur de déchets et mise au rebut conformément aux réglementations locales. Retourner ensuite la plaque sur du papier absorbant pour éliminer l'humidité résiduelle. Laver ensuite la plaque cinq fois systématiquement avec 300 µl de tampon de lavage. S'assurer que les puits sont complètement vidés en les tapotant après chaque lavage sur un morceau de papier absorbant encore sec et inutilisé.

En cas d'utilisation d'un laveur de microplaques ou d'un système ELISA entièrement automatisé, veiller à ce que l'appareil soit correctement réglé. Demander, au besoin, au fabricant de vous en fournir les réglages. Les appareils fournis par R-Biopharm sont déjà programmés avec des réglages et des protocoles de travail validés. Pour éviter d'obstruer les aiguilles de lavage, il convient de n'utiliser que des suspensions de selles dépourvues de particules (voir paragraphe 9.3, Préparation des échantillons). S'assurer également que tout le liquide est aspiré à chaque étape de lavage.

9.6. Deuxième incubation

À l'aide d'une pipette, ajouter 100 µl de conjugué polyperoxydase-streptavidine [Conjugate | 2] dans les puits, puis incuber pendant 30 minutes à température ambiante (20 à 25 °C).

9.7. Lavage

Laver en suivant les instructions de la rubrique 9.5.

9.8. Troisième incubation

Ajouter 100 µl de substrat [Substrate] dans tous les puits. Ensuite, incuber la plaque à température ambiante (20 à 25 °C), dans le noir, pendant 15 minutes. Remplir ensuite tous les puits avec 50 µl de réactif d'arrêt [Stop] afin d'arrêter la réaction. Après un mélange soigneux en tapotant légèrement le côté de la plaque, mesurer l'extinction à 450 nm (en variante : à 450/620 nm). Le réglage de la valeur nulle doit s'effectuer dans l'air, et donc sans la microplaque.

Remarque :

Des échantillons de patients fortement positifs peuvent entraîner des précipités noirâtres du substrat.

10. Contrôle qualité – signes de réactif périmé

À des fins de contrôle qualité, chaque fois qu'un test est effectué, il est nécessaire d'utiliser des contrôles positif et négatif, pour vérifier la stabilité des réactifs et la réalisation correcte du test. Le test s'est déroulé correctement lorsque la valeur d'extinction (DO) du contrôle négatif à 450 nm est inférieure à 0,2 (inférieure à 0,160 à 450/620 nm) et lorsque la valeur mesurée du contrôle positif est supérieure à 0,8 à 450 nm ou à 450/620 nm. Une valeur supérieure à 0,2 (0,160) pour le contrôle négatif pourrait indiquer que le lavage n'a pas été suffisant. Tout écart par rapport aux valeurs requises, par exemple la présence de turbidité ou d'une coloration bleue du substrat incolore avant le remplissage des puits, pourrait indiquer une dénaturation des réactifs. En cas d'écart par rapport aux valeurs indiquées, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Capacité de fonctionnement de l'équipement utilisé (par ex. étalonnage)
- Procédure de test correcte
- Inspection visuelle des composants de la trousse à la recherche d'une contamination ou de fuites ; une solution de substrat devenue bleue ne doit pas être utilisée.

Si les conditions ne sont toujours pas satisfaites après avoir recommencé le test, consulter le fabricant ou un distributeur R-Biopharm local.

11. Évaluation et interprétation

11.1. Calcul de la valeur seuil

Pour déterminer la valeur seuil, on ajoute 0,15 unité d'extinction à l'extinction mesurée du contrôle négatif.

$$\text{Valeur seuil} = \text{valeur d'extinction du contrôle négatif} + 0,15$$

11.2. Résultats du test

Un échantillon est estimé comme étant **positif** lorsque sa valeur d'extinction est supérieure de plus de 10 % à la valeur seuil calculée.

Un échantillon est estimé comme étant **limite** si sa valeur d'extinction se situe dans une plage allant de -10 % à +10 % de la valeur seuil. Si un nouvel examen utilisant un nouvel échantillon de selles obtient une valeur comprise dans cette même plage d'ombre, l'échantillon est considéré comme étant négatif.

Des échantillons ayant des valeurs d'extinction inférieures à -10 % de la valeur seuil calculée doivent être considérés comme étant **négatifs**.

12. Limites de la méthode

Le test RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi permet de déterminer les antigènes de *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis*, et/ou de *Giardia lamblia*. Il n'est pas possible d'en déduire un rapport entre le niveau d'une valeur d'extinction déterminée et l'apparition ou la gravité des symptômes cliniques. **Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés conjointement aux signes et symptômes cliniques.**

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

Un résultat négatif n'exclut pas une éventuelle cryptosporidiose ou giardiase. Un tel résultat peut être causé par l'élimination temporaire des agents pathogènes ou par une quantité trop faible d'antigène dans l'échantillon. Si l'anamnèse est en faveur d'une suspicion d'infection par l'un quelconque des deux agents pathogènes, un autre prélèvement de selles doit être examiné.

Un résultat **limite** peut être causé par une répartition non homogène des antigènes dans l'échantillon de selles. Dans un tel cas, l'examen doit être répété avec une deuxième suspension provenant du même échantillon ou il convient de demander un autre prélèvement de selles à examiner.

13. Performances

13.1 Étude de comparaison clinique

Une investigation clinique a évalué en Grande-Bretagne le test RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi avec un total de 240 échantillons de selles (études prospective et rétrospective en aveugle). Cette investigation a comparé les méthodes établies britanniques de microscopie pour *Giardia* (coloration à l'iode dans une émulsion de solution saline) et *Cryptosporidium* (coloration à l'auramine-phénol et de Ziehl-Neelsen) et une PCR de différenciation en temps réel. Les résultats de cette étude sont indiqués dans le tableau 1.

Tableau 1 : Comparaison entre le test RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi ELISA et la microscopie et la PCR en temps réel

		Microscopie		PCR en temps réel	
		Positif	Négatif	Positif	Négatif
RIDASCREEN® Cryptosporidium/ Giardia	Positif	25	24	47	2
	Négatif	1	190	2	189

IC : Intervalle de confiance

Sensibilité (IC) :	96 % (80-100)	96 % (86-100)
Spécificité (IC) :	89 % (84-93)	99 % (96-100)

13.2 Sensibilité analytique

Afin de déterminer la sensibilité analytique du test RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi ELISA, une série de dilutions linéaire d'un échantillon renfermant une quantité connue de kystes de Giardia a été préparée et mesurée en triple. Le seuil de détection (LD) est la dernière concentration évaluée comme étant positive dans toutes les répétitions. Les résultats de ces mesures sont indiqués dans le tableau 2.

Tableau 2 : Résultats de la sensibilité analytique pour le test RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi ELISA

Kystes de Cryptosporidium/ Réaction	VM [DO 450/620]	Résultats
5×10^5	1,728	Positif
$2,5 \times 10^5$	0,740	Positif
$1,25 \times 10^5$	0,449	Positif
$6,25 \times 10^4$	0,216	Positif
$3,12 \times 10^4$	0,104	Négatif
$1,56 \times 10^4$	0,053	Négatif
7812	0,020	Négatif
3906	0,016	Négatif

Kystes de Giardia/ Réaction	VM [DO 450/620]	Résultats
$1,25 \times 10^5$	1,630	Positif
$6,25 \times 10^4$	0,803	Positif
$3,12 \times 10^4$	0,440	Positif
$1,56 \times 10^4$	0,191	Positif
7812	0,084	Négatif
3906	0,049	Négatif
1953	0,012	Négatif

13.3 Étude de comparaison clinique

Différents micro-organismes pathogènes du tractus intestinal ont été examinés avec le test RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi et à l'exception de *Campylobacter coli*, ils n'ont pas présenté de réactivité croisée. Ces études ont été réalisées avec des suspensions de bactéries ou de virus non diluées dont les concentrations étaient de 10^6 à 10^9 organismes par ml. Les résultats de cette étude sont indiqués dans le tableau 3.

Tableau 3 : Réactivité croisée avec des micro-organismes pathogènes

Organisme	Origine	Valeur moyenne [DO 450/620]
Adénovirus	Surnageant de culture cellulaire	0,017
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Culture	0,040
<i>Arcobacter butzleri</i>	Culture	0,030
Astrovirus	Surnageant de culture cellulaire	0,002
<i>Bacillus cereus</i>	Culture	0,011
<i>Bacteroides fragilis</i>	Culture	0,013
<i>Campylobacter coli</i>	Culture	0,231
<i>Campylobacter jejuni</i>	Culture	0,017
<i>Candida albicans</i>	Culture	0,014
<i>Citrobacter freundii</i>	Culture	0,018
<i>Clostridium difficile</i>	Culture	0,011
<i>Clostridium perfringens</i>	Culture	0,014
<i>Clostridium sordellii</i>	Culture	0,017
<i>E. coli</i> EPEC	Culture	0,015
<i>E. coli</i> ETEC	Culture	0,020
<i>E. coli</i> STEC	Culture	0,019
<i>Entamoeba histolytica</i>	Culture	0,004
<i>Enterobacter cloacae</i>	Culture	0,012
<i>Enterococcus faecalis</i>	Culture	0,013
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Culture	0,017
<i>Proteus vulgaris</i>	Culture	0,017
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Culture	0,016
Rotavirus	Surnageant de culture cellulaire	0,058
<i>Salmonella enteritidis</i>	Culture	0,016
<i>Salmonella typhimurium</i>	Culture	0,018
<i>Serratia liquefaciens</i>	Culture	0,015
<i>Shigella flexneri</i>	Culture	0,011
<i>Staphylococcus aureus</i>	Culture	0,035
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Culture	0,016
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Culture	0,017
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Culture	0,012

13.4. Précision

Afin de déterminer la reproductibilité intra-test, 40 répétitions de ces références ont été mesurées, couvrant l'ensemble de la plage de mesure des valeurs négatives à fortement positives. Les valeurs moyennes et les coefficients de variation (CV) ont été déterminés pour

trois lots de trousse. Pour ce qui est de la reproductibilité intra-test, les références de dix jours de travail différents ont été mesurées en double, avec deux passages par jour. Les mesures ont été effectuées par trois techniciens et trois lots de trousse. La reproductibilité inter-lots a été déterminée sur les trois lots de trousse. Les résultats de cette étude sont indiqués dans le tableau 4.

Tableau 4 : Reproductibilité/précision du test RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi ELISA

Référence		Intra-test			Inter-tests			Inter-lots
		Lot de la trousse 1	Lot de la trousse 2	Lot de la trousse 3	Lot de la trousse 1	Lot de la trousse 2	Lot de la trousse 3	Lot de la trousse 1-3
1	VM [DO 450/620]	1,948	2,393	2,142	1,881	2,186	1,909	1,992
	CV (%)	8,42%	7,87%	6,74%	15,26%	8,79%	12,44%	14,58%
2	VM [DO 450/620]	1,653	2,033	1,584	1,543	1,778	1,551	1,624
	CV (%)	6,28%	6,65%	10,78%	15,94%	11,13%	13,04%	15,42%
3	VM [DO 450/620]	1,045	1,241	1,264	0,970	1,119	1,120	1,070
	CV (%)	7,08%	7,13%	6,99%	23,06%	16,75%	15,26%	19,58%
4	VM [DO 450/620]	0,839	0,918	0,863	0,721	0,848	0,768	0,779
	CV (%)	3,73%	6,03%	5,64%	22,42%	15,44%	15,77%	19,26%
5	VM [DO 450/620]	0,552	0,573	0,601	0,476	0,564	0,512	0,517
	CV (%)	10,42%	8,43%	4,55%	25,53%	17,20%	14,97%	20,72%
6	VM [DO 450/620]	0,285	0,348	0,298	0,302	0,347	0,302	0,317
	CV (%)	13,26%	6,97%	5,02%	23,43%	16,60%	22,27%	21,73%

13.5. Substances interférentes

Les substances mentionnées ci-dessous n'ont pas présenté d'effet sur les résultats du test lorsqu'elles ont été mélangées dans les échantillons de selles positifs et négatifs pour Cryptosporidium et Giardia dans les concentrations indiquées :

sulfate de baryum (produit de contraste pour les radiographies par rayons X, 18,5 % p/p),

lopéramide (antidiarrhéique, 0,02 % p/p), Pepto-bismol (antidiarrhéique, 6,6 % v/p), cyclamate (édulcorant artificiel, 1,3 % v/p), métronidazole 0,5 (antibiotique, 3,0 % v/p), acide stéarique/acide palmitique (graisses dans les selles, mélange 1/1, 40,0 % p/p), diclofénac (analgésique, 0,1 % v/p).

Dans le cas du sang humain (5,0 % v/p) et des mucines (5,0 % p/p), les éventuelles relations entre la dose et l'effet ont été étudiées tel que décrit ci-dessous.

L'investigation avec une dilution en série avec le sang humain n'a pas mis en évidence de relation directe entre la concentration et les valeurs de DO. La seule exception est la concentration la plus élevée testée ; elle est encore bien supérieure à la concentration physiologique normale. Une interférence due au sang humain peut donc être considérée comme étant improbable.

Les tests avec les mucines ont confirmé la première analyse, avec des valeurs de DO distinctement et constamment en diminution, déterminées plusieurs fois dans toutes les dilutions en série des échantillons positifs pour *Cryptosporidium*. Ce résultat n'a pas été observé dans les échantillons positifs pour *Giardia*. Quoiqu'il en soit, les mucines doivent être considérées comme étant des substances interférentes.

Annexe

Symboles spécifiques au test :

Plate	Microplaque
Diluent 1	Tampon de dilution d'échantillon
Wash	Tampon de lavage
Control +	Contrôle positif
Control -	Contrôle négatif
Conjugate 1	Conjugué 1
Conjugate 2	Conjugué 2
Substrate	Substrat
Stop	Réactif d'arrêt

Bibliographie

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).
9. Black, R. E. et al.: Giardiasis in day-care centers: Evidence of person-to-person transmission. *Pediatrics* 60 (No. 4), 486 - 491 (1977).
10. Craun, G. F.: Waterborne Giardiasis in the United States: A review. *Am. J. Pub. Health* 69 (No. 8), 817 - 819 (1979).
11. Nask, T. E. et al.: Experimental human infections with Giardia lamblia. *J. Infect. Dis.* 156 (No. 6), 974 - 984 (1987).
12. Smith, H. V. et al.: Giardia and Giardiasis: What's in a name? *Microbiol. Eur.* 3 (No. 1), 22 - 29 (1995).
13. Thompson, R. C. A., Reynoldson, J. A.: Giardia and Giardiasis. *Adv. Parasitol.* 32, 71 - 160 (1993).
14. Xiao, L.: Giardia infection in farm animals. *Parasitology today* 10 (No. 11), 436 - 438 (1994).
15. 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)