

RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi

Codice prodotto: C1121



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*. Il test RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi è un dosaggio immunoenzimatico per la rilevazione qualitativa di *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis* e/o *Giardia lamblia* in campioni di feci umane.

2. Sintesi e spiegazione del test

Gli organismi *Giardia lamblia* sono parassiti flagellati che causano infezioni nell'intestino tenue degli esseri umani in seguito all'assunzione delle cisti per via orale. Essendo presente in tutto il mondo, l'agente patogeno *Giardia lamblia* è una causa significativa di diarrea cronica, in particolare nei casi medici correlati ai viaggi. L'infezione si verifica in seguito all'ingestione di cisti attraverso cibo o acqua contaminati. Negli USA, l'agente patogeno *Giardia lamblia* è la causa più frequente di malattia con diarrea correlata all'assunzione di acqua. Nei paesi sottosviluppati, l'infezione da giardia è una delle cause più frequenti di malattie nei bambini di età inferiore ai dieci anni, con una prevalenza di 15 - 20 %. La giardiasi (lambliasi) si manifesta sotto forma di diarrea acuta o cronica e anche soggetti asintomatici possono espellere le cisti del parassita. Il periodo di incubazione è compreso tra 3 e 42 giorni.

L'infezione acuta presenta i seguenti sintomi: comparsa improvvisa di diarrea acquosa (feci frequenti di colore giallo e consistenza schiumosa e odore sgradevole accompagnate da flatulenza), inappetenza, nausea, letargia e perdita di peso.

In passato, il metodo più spesso utilizzato per diagnosticare la lambliasi era esaminare campioni di feci al microscopio per rilevare le cisti e questo metodo richiede la presenza di personale esperto. Inoltre è necessario condurre questi test in una sequenza di più campioni di feci distribuiti in un periodo di tempo prolungato in quanto la frequenza di escrezione delle cisti può variare notevolmente.

La criptosporidiosi è un'infezione protozoica causata dal genere *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 immunoincompetenti, nei quali la diarrea ha un decorso molto difficile e persistente. L'infezione può essere trasmessa dall'animale all'uomo per mezzo di acqua contaminata, ma 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.

Un'alternativa importante all'analisi al microscopio è offerta dal qui descritto test Cryptosporidium/Giardia Combi ELISA, che consente l'esame simultaneo di entrambi questi

agenti patogeni nei campioni di feci. 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/Giardia Combi utilizza anticorpi monoclonali specifici in un metodo a sandwich. La superficie dei pozzetti della micropiastra viene rivestita con anticorpi specifici agli antigeni di cryptosporidium e delle specie patogene di giardia. Una sospensione del campione di feci da esaminare e i controlli vengono introdotti nel pozzetto della piastra per microtitolazione insieme ad anticorpi anti-cryptosporidium e anti-giardia 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 antigeni di cryptosporidium e/o giardia in un campione, si forma un complesso a sandwich composto dagli anticorpi immobilizzati, dall'antigene di cryptosporidium e/o giardia 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 e/o giardia 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 antigeni di <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Cryptosporidium hominis</i> e <i>Giardia lamblia</i>
Diluent 1	100 ml	Tampone di diluizione dei campioni, soluzione proteica tamponata NaCl; pronto per l'uso, colorazione in 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 cryptosporidium e giardia 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 di cryptosporidium e giardia 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 utilizzabile per quattro settimane se conservato a 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 per 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)
- Vorticatore (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

Solo 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 e giardia inattivato. Deve essere trattato come potenzialmente infettivo, analogamente ai campioni dei pazienti, e maneggiato in conformità alle disposizioni di sicurezza nazionali vigenti.

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 e i prelievi rettali non devono essere riposti in contenitori per il trasporto contenenti sostanze per il trasporto come conservanti, sieri animali, ioni metallici, agenti ossidanti e detergenti, in quanto potrebbero crearsi interferenze con il test RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi.

Se vengono usati prelievi 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 ambi-

ente (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 o sigillare con una pellicola in plastica la piastra per microtitolazione 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. Eventuali cristalli presenti nel concentrato devono essere precedentemente riscaldati in un bagnomaria a 37 °C per scioglierli.

9.3 Preparazione dei campioni

Introdurre in una provetta marcata 1 ml di tampone per diluizione dei campioni RIDASCREEN® **Diluent | 1**. Utilizzare una pipetta monouso (codice prodotto Z0001) per aspirare un campione di feci liquide (circa 100 µl) fino a superare di poco la seconda graduazione e aggiungerlo al tampone nella provetta per ottenere una sospensione.

Per sospendere un campione di feci solido, utilizzare una quantità equivalente (circa 50 – 100 mg) del campione, maneggiandolo 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 vortificatore. Lasciare riposare la sospensione per un breve periodo (10 minuti) 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 il diluente **Diluent | 1**.

9.4. Prima incubazione

Dopo aver inserito un numero sufficiente di pozzetti nel telaio di fissaggio, 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 60 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 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, introdurre solo sospensioni di feci 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 30 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 bloccante **Stop** per arrestare la reazione. Dopo aver accuratamente miscelato picchiettando 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 (OD) 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 superiori al 10 % al di sotto del limite calcolato devono essere considerati **negativi**.

12. Limiti del metodo

Il test RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia può determinare la presenza di antigeni di *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis* e/o *Giardia lamblia*. 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 tenendo conto dei segni e dei sintomi clinici.**

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

Un risultato negativo non esclude la possibilità di criptosporidiosi o giardiasi. Un risultato simile può essere dovuto a escrezione intermittente degli agenti patogeni oppure è possibile che la quantità di antigeni nel campione sia insufficiente. Qualora a livello anamnestico sussista il sospetto di infezione da parte di uno dei due agenti patogeni, l'esame deve essere ripetuto con un altro campione di feci.

Un risultato **marginale** può essere dovuto a distribuzione non omogenea di antigeni 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. Studio di comparazione clinico

Un'indagine clinica condotta in Gran Bretagna ha valutato il test RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia 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 giardia (colorazione con iodio in emulsione salina) e cryptosporidia (colorazione auramina-fenolo e Ziehl-Neelsen) nonché la differenziazione della PCR in tempo reale. I risultati di questo studio sono riepilogati nella Tabella 1.

Tabella 1: Confronto del test RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi ELISA con l'analisi al microscopio e la PCR in tempo reale

		Analisi al microscopio		PCR in tempo reale	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
RIDASCREEN® Cryptosporidium / Giardia	Positivo	25	24	47	2
	Negativo	1	190	2	189

IC: Intervallo di confidenza

Sensibilità (IC):	96 % (80-100)	96 % (86-100)
Specificità (IC):	89 % (84-93)	99 % (96-100)

13.2 Sensibilità analitica

Per determinare la sensibilità analitica del test RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi ELISA, è stata prodotta e quindi misurata in triplicati una serie di diluizione lineare tratta da un campione con una quantità nota di cisti di giardia. Il limite di rilevazione (LoD) è l'ultima concentrazione valutabile come positiva in tutti i replicati. I risultati di dette misurazioni sono presentati nella Tabella 2.

Tabella 2: Risultati di sensibilità analitica del test RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi ELISA

Cisti di cryptosporidium/ Reazione	MV [OD 450/620]	Risultati
5×10^5	1,728	Positivo
$2,5 \times 10^5$	0,740	Positivo
$1,25 \times 10^5$	0,449	Positivo
$6,25 \times 10^4$	0,216	Positivo
$3,12 \times 10^4$	0,104	Negativo
$1,56 \times 10^4$	0,053	Negativo
7812	0,020	Negativo
3906	0,016	Negativo

Cisti di giardia/ Reazione	MV [OD 450/620]	Risultati
$1,25 \times 10^5$	1,630	Positivo
$6,25 \times 10^4$	0,803	Positivo
$3,12 \times 10^4$	0,440	Positivo
$1,56 \times 10^4$	0,191	Positivo
7812	0,084	Negativo
3906	0,049	Negativo
1953	0,012	Negativo

13.3. Reattività incrociata

Diversi microrganismi patogeni del tratto intestinale sono stati esaminati con il test RIDASCREEN® Cryptosporidium/Giardia Combi 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 riepilogati nella Tabella 3.

Tabella 3: Reattività incrociata con microrganismi patogeni

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

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 riprodu-

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

13.5. Sostanze interferenti

Le sostanze include nell'elenco seguente non hanno mostrato effetti sui risultati dei test quando miscelate in campioni di feci positivi e negativi a cryptosporidium e giardia 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 (edulcorante artificiale, 1,3% v/w), metronidazolo (antibiotico, 3,0% v/w), acido stearico/acido palmitico (grassi nelle feci, miscela 1:1, 40,0% w/w), diclofenac (farmaco analgesico, 0,1%

v/w). Per il sangue umano (5,0% v/w) e le mucine (5,0% w/w) sono stati analizzati possibili relazioni di dose/effetto come descritto di seguito.

Questa indagine di una diluizione seriale con sangue umano non ha tuttavia mostrato una relazione diretta tra la concentrazione e i valori OD. L'unica eccezione è la massima concentrazione testata che è risultata molto superiore alla normale concentrazione fisiologica. Di conseguenza l'interferenza dovuta al sangue umano può essere considerata improbabile.

I test con le mucine hanno confermato la prima analisi, con valori OD distintamente e costantemente decrescenti determinati in maniera ripetuta in tutte le diluizioni seriali dei campioni positivi al cryptosporidium. Questo non è stato osservato nei campioni di feci positivi alla giardia. Nel complesso, le mucine devono essere considerate come sostanze interferenti.

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 bloccante

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).
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)